

**Zur Kristallstruktur der Thylakoide von
Rhodopseudomonas Viridis**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
am Fachbereich Chemie
der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt 1973
von Max Joachim Paulick
aus Bautzen/Sachsen**



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Zur Kristallstruktur der Thylakoide von Rhodopseudomonas Viridis

Inaugural-Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde
am Fachbereich Chemie
der Freien Universität Berlin**

vorgelegt 1973

**von Max Joachim Paulick
aus Bautzen/Sachsen**

1. Gutachter: Professor Dr. H. BRADACZEK

2. Gutachter: Professor Dr. P. GIESBRECHT



Tag der mündlichen Prüfung: 2. Mai 1973

A. EINLEITUNG	1
B. EXPERIMENTELLER TEIL UND EINZELERGEBNISSE	
1. Aufbereitung des Untersuchungsmaterials	6
2. Elektronenmikroskopische Untersuchungen	8
Dünnschnitttechnik	8
Tropfpräparation	9
Negativkontrastierung	9
Platin/Kohlenstoff -Bedampfung	9
Gefrierätzung	10
Visuelle Auswertung und Ergebnisse	10
Optische Diffraction	11
Ein einfaches Laser-Diffraktometer	12
Ergebnisse der Auswertung elektronenmikrosko- pischer Aufnahmen mit dem Laser-Diffraktometer	16
3. Röntgenographische Analyse	19
Röntgenpräparation	19
Ein spezielles Präparationsverfahren	21
Aufnahmetechnik	24
Auswertung	25
Rechnerische Bestimmung der Parameter des Thylakoidgitters	32
Annäherung der Gitterparameter und Indizierung der d-Werte mit Hilfe des reziproken Gitters	33
Intensitätsauswertung	36
Größe der streuenden Bereiche	37
Ergebnisse der röntgenographischen Untersuchungen	37

C. DISKUSSION	Seite
Korrelation	41
Biologisches Modell	48
D. ZUSAMMENFASSUNG	57
E. ANHANG	
Reelles und reziprokes Gitter	60
Fehlerbetrachtung	62
F. LITERATURVERZEICHNIS	65
G. LEBENS LAUF	67

A. EINLEITUNG

In einer Zelle benötigen chemische und energetische Reaktionen, genau wie im Laboratorium, einen abgeschlossenen Reaktionsraum. Biologische Membranen trennen diesen Reaktionsraum von der Zelle so ab, daß Stoffwechselprodukte antransportiert und abtransportiert werden können. - Der Analyse dieser Membranen wird große Bedeutung zugemessen.

Eine kleine Gruppe von Bakterien, systematisch gehört sie zu den Rhodobacteriineae, hat photochemisch aktive Membranen. Für diese wurde von MENKE (13) der Begriff Thylakoid ($\theta\acute{\upsilon}\lambda\alpha\kappa\omicron\varsigma$ - Sack, Beutel, Schlauch) geprägt. In dem grünen Bakterium *Rhodopseudomonas viridis* liegen diese Thylakoide als dichtgepackte, massive Stapel vor.

Eine phänomenologische Darstellung der Organisation dieser Thylakoidstapel in den Bakterien geben GIESBRECHT und DREWS (5). Danach bilden bis zu elf Einzelthylakoide Stapel, die bis zu 1.4 μm lang, 1.2 μm breit und 0.2 μm dick werden können. Abbildung 1 zeigt einen solchen Thylakoidstapel (Pfeile) in einer längsgeschnittenen Zelle von *Rhodopseudomonas viridis*. An einem Querschnitt durch zwei Zellen wird sichtbar (Abb. 2), daß der Thylakoidstapel an der Zellwand zylindrisch anliegt. In den Abbildungen 5 und 6 ist dies mit Hilfe der Gefrierätzung dargestellt.

Auf den Thylakoidflächen bilden "hohle Granula" ein fast hexagonales "Flächengitter". Es ist in Abbildung 3 deutlich zu erkennen. Der Innenraum oder "loculus" der Thylakoide (Abb. 5 und 6, schwarze Pfeile) unterscheidet sich deutlich von der Schicht zwischen den Thylakoiden, dem sogenannten "interdisk-space" (Abb. 5 und 6, weiße Pfeile). Dieser "interdisk-space" ist nach GIESBRECHT und DREWS etwa 30 $\text{\AA}$ dick, während für

den "loculus" 50 Å bis 80 Å angegeben werden. Die Dicke eines Thylakoids beträgt etwa 190 Å bis 200 Å. Für die Identitätsperioden im "Flächengitter" werden 100 Å genannt.

Diese hochgeordnete, photochemisch aktive Membranstruktur ist Objekt der vorliegenden Untersuchung.

Sollen derartige Strukturen untersucht werden, so sind zwei grundverschiedene Wege denkbar: Eine elektronenmikroskopische oder eine röntgenographische Untersuchung. Diese Methoden sind voneinander völlig unabhängig. Angewendet wurden sie bisher nur voneinander getrennt.

In dieser Arbeit werden beide Wege beschritten. Dies geschah in der Hoffnung, daß es möglich sein sollte, die Nachteile der elektronenmikroskopischen Analyse der Thylakoidstruktur durch die Vorteile der röntgenographischen Untersuchung zu kompensieren und umgekehrt.

Die elektronenmikroskopischen Aussagen von GIESBRECHT und DREWS werden anhand einer statistisch auswertbaren Anzahl von Detailmessungen präzisiert. Dies erfolgt durch visuelle Auswertung und durch Anwendung der optischen Diffraction bei der Auswertung elektronenmikroskopischer Aufnahmen. Die Wirkungsweise und der Bau eines Laser-Diffraktometers werden beschrieben.

Die Beugung monochromatischer Röntgenstrahlen an den Thylakoidstapeln von *Rhodospseudomonas viridis* soll schließlich exakte Angaben über den geometrischen Aufbau der Thylakoidstapel erlauben.

Im Rahmen dieser Arbeit wird versucht, ein biologisches Problem mit kristallographischen Mitteln zu klären. Das bedingt eine für Nicht-Kristallographen verständliche, ausführliche Darstellung der mathematischen Zusammenhänge und eine für Nicht-Biologen verständliche Wiedergabe der elektronenmikroskopischen Präparationstechniken.



Abb. 1: *Rhodospseudomonas viridis*; Längsschnitt durch ein Bakterium, EM 90 000 : 1. Sechs Thylakoide bilden einen Thylakoidstapel, der in Richtung der Stäbchennormalen angeschnitten ist (GIESBRECHT, DREWS, 5).

Abb. 2: *Rhodospseudomonas viridis*; Querschnitt durch zwei Bakterien, EM 120 000 : 1. Die Thylakoidstapel sind halbkreisförmig gekrümmt. Durch den Einfluß von Fixierungsmitteln ist die Form der Bakterien verändert, der Querschnitt ist nicht mehr kreisförmig (GIESBRECHT, 6).

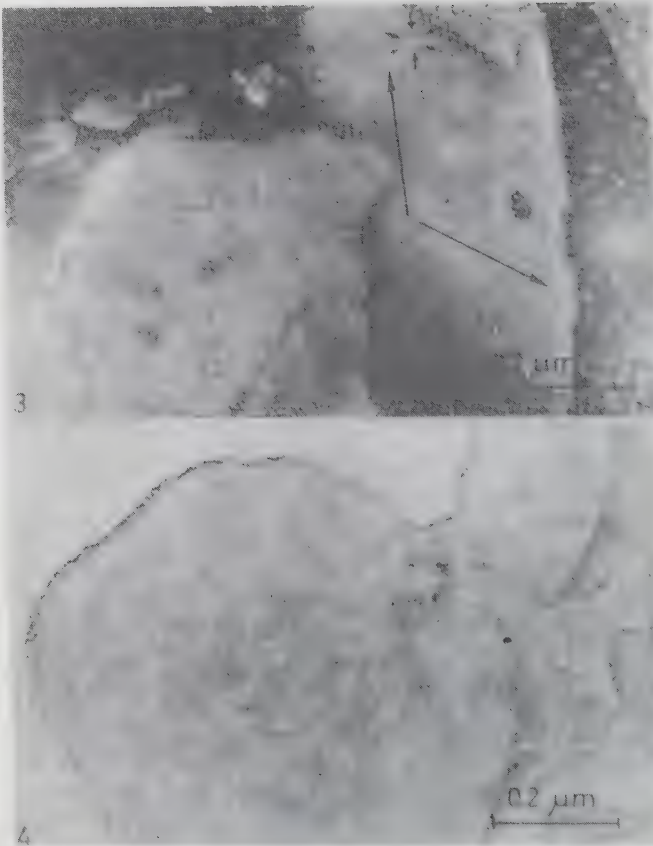


Abb. 3: *Rhodospseudomonas viridis*; isolierte Thylakoide, Thylakoidflächen durch Negativkontrastierung dargestellt, EM 150 000 : 1. Die Richtungen des "Flächengitters" sind deutlich zu erkennen, die Partikel scheinen hexagonal angeordnet zu sein (GIESBRECHT, 7).

Abb. 4: *Rhodospseudomonas viridis*; isolierte Thylakoide, Thylakoidflächen durch Pt/C-Bedampfung dargestellt, EM 100 000 : 1. Das "Flächengitter" ist offenbar gestört, Einzelheiten sind hier schlechter zu erkennen als in Abb. 3 (GIESBRECHT, DREWS, 5).

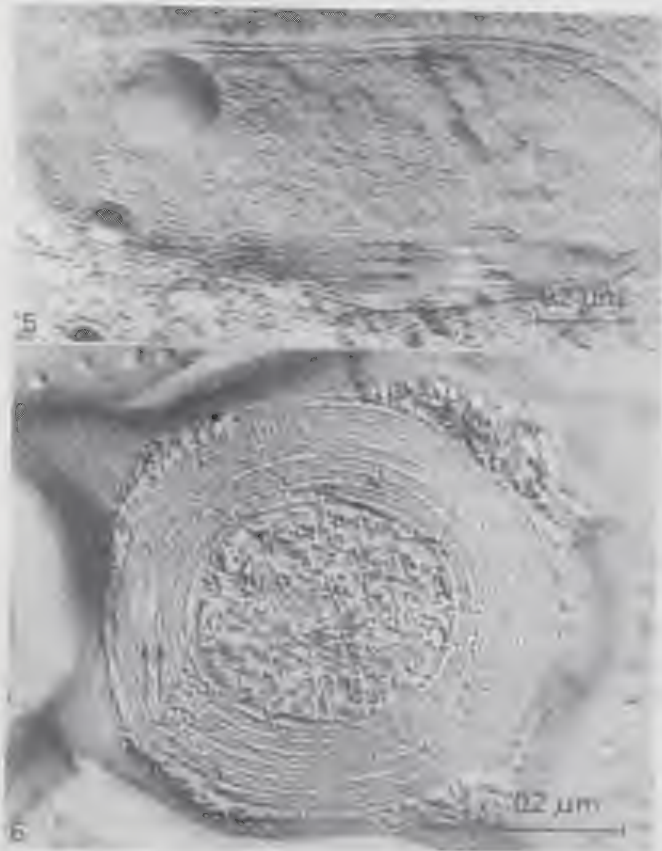


Abb. 5: *Rhodospirillum rubrum*; Längsbruch durch ein Bakterium, Gefrierätzung, EM 90 000 : 1 (GIESBRECHT, 7).

Abb. 6: *Rhodospirillum rubrum*; Querbruch durch ein Bakterium, Gefrierätzung, EM 130 000 : 1 (GIESBRECHT, 7).

In den Abbildungen 5 und 6 ist der Aufbau der Thylakoidstapel deutlich zu erkennen. Die Einzelthylakoide sind durch den sogenannten "interdisk-space" (weiße Pfeile) voneinander getrennt. Er ist etwa halb so dick wie der Thylakoid-Innenraum, der sogenannte "loculus" (schwarze Pfeile).

B. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Aufbereitung des Untersuchungsmaterials

Die Gewinnung der Thylakoide von *Rhodospseudomonas viridis* für elektronenmikroskopische Untersuchungen ist ohne große Schwierigkeiten möglich. Eventuell vorhandene Verunreinigungen sind im elektronenmikroskopischen Bild leicht zu erkennen. Selbst für eingehende Untersuchungen werden nur einige hundert Milligramm benötigt: Sie lassen sich nach einem von GIESBRECHT und DREWS (5) beschriebenen Verfahren bei 4° bis 5° C durch Zentrifugation im Saccharose-Gradienten gewinnen.

Für die röntgenographische Analyse sind als Ausgangsmaterial jedoch mindestens zwei Gramm isolierte und hochgereinigte Thylakoide notwendig. Die von GIESBRECHT und DREWS benutzte Methode erwies sich als zur Herstellung so großer Mengen ungeeignet; sie mußte zweckentsprechend modifiziert werden. Nach einigen Versuchen ergab sich folgendes Verfahren:

Rhodospseudomonas viridis werden unter anaeroben Bedingungen im Licht in einer Nährlösung für *Athiorhodaceen* 21 Tage kultiviert (5). Sie werden durch Abzentrifugieren bei 15 000 g geerntet. Anschließend wird fünfmal mit Phosphatpuffer p_H 7.1 und zweimal mit aqua bidest. gewaschen. Geht man von einer 20 l-Kultur aus, so beträgt die Ausbeute etwa 20 g *Rhodospseudomonas viridis* (Naßgewicht).

Aufgeschlossen werden die Bakterien rein mechanisch. Dies geschieht im Bühler-Homogenisator bei 0° C durch zwanzigminütiges Schütteln mit Styrolperlen ($\varnothing$ 0.1 mm). Dabei darf ein Volumenverhältnis von Bakterien zu Styrolperlen gleich 1:10 nicht überschritten werden.

Die Zellanteile werden auf einer Fritte aus den Styrolperlen gewaschen; als Waschflüssigkeit dient eine 2%ige CsCl-Lösung.

Die Rohreinigung des Extraktes erfolgt durch Zentrifugieren bei 10 000 g. Dabei verbleiben nur etwa ein Drittel der Thylakoide im Überstand, zwei Drittel werden von den schwereren Zellbestandteilen in das Sediment gerissen.

Das Sediment wird deshalb in 2%iger CsCl-Lösung aufgenommen und im Homogenisator nach Potter-Elvehjem (Glaszylinder, rotierender Teflonkolben) behandelt. Die zwischen Teflonkolben und Glaswand auftretenden Scherkräfte trennen die verklebten Teilchen und nach erneuter Zentrifugation bei 10 000 g enthält der Überstand weitere Thylakoide. Diese Behandlung des Sediments wird insgesamt dreimal durchgeführt.

Die gesammelten Überstände enthalten dann etwa 50% der in den Bakterien enthaltenen Thylakoide. Durch eine scharfe Zentrifugation bei 100 000 g werden sie von der Waschflüssigkeit abgetrennt. Elektronenmikroskopische Kontrollen zeigen (Tropfpräparation, Negativkontrastierung), daß die Thylakoide danach verhältnismäßig rein vorliegen.

Orientierungsversuche mit der analytischen Ultrazentrifuge ergaben, daß die Dichte der Thylakoide bei $\rho = 1.24 \text{ g/cm}^3$ liegt. Das Thylakoidsediment wird daher mit Hilfe des Homogenisators nach Potter-Elvehjem in CsCl-Lösung der Dichte $\rho = 1.3 \text{ g/cm}^3$ (Brechungsindex $n = 1.362$) suspendiert und in einem Schwingbecherrötor während einhundert Stunden einer reinen Dichtegradienten-Zentrifugation unterzogen. Danach bilden die Thylakoide in der Mitte der Zentrifugenröhrchen eine intensiv grüngefärbte Zone. Schwerere und leichtere Zellanteile sammeln sich unterhalb und

oberhalb der Thylakoidzone. Mittels einer langsamlaufenden Schlauchpumpe werden die Thylakoide separiert und durch mehrfaches Waschen mit aqua bidest. vom anhaftenden CsCl befreit. Die Ausbeute beträgt 4 bis 5 g, entsprechend 20% bis 25% des Bakterien-Naßgewichtes.

2. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Eine detaillierte Beschreibung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen ist im Rahmen dieser Arbeit nicht beabsichtigt. Präparations- und Auswertemethoden werden nur soweit beschrieben, wie es die Darstellung und Diskussion der Ergebnisse erfordern.

Dünnschnitttechnik

Abzentrifugierte *Rhodospseudomonas viridis* oder ihre Thylakoide werden in einer Lösung von Osmiumtetroxid (OsO_4 , 1.5%) und Kaliumdichromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, 1.65%) eine Stunde fixiert und kontrastiert. Dann wird abzentrifugiert und ausgewaschen. Das Sediment wird in 2%igem Agar, angesetzt in 20% Meereswasser, aufgenommen und nach dem Erstarren in kubikmillimetergroße Blöckchen geschnitten. Das Entwässern der Präparate erfolgt in einer Alkoholreihe (30:70 bis 100:0, die Mischungen sind mit Saccharose gesättigt) und anschließend in Aceton. In einer Vestopal¹⁾/Aceton-Mischreihe läßt man das Einbettungsmittel Vestopal langsam in die biologische Struktur eindringen. Nach Zugabe des für die Polymerisation erforderlichen Initiators und Aktivators erfolgt bei 60° C in zwei Tagen das Aushärten.

Mit Hilfe eines geeigneten Mikrotoms können danach 200 Å bis 400 Å dicke Schnitte erhalten werden. Auf

1) Vestopal - Divinylbenzen-Methacrylat, Einbettungsmittel der Firma Jaeger, Genf.

mit Formvar¹⁾ befilmten Kupfernetzen können die Schnitte danach im Elektronenmikroskop untersucht werden: sie geben Auskunft über die Stapelung der Thylakoide.

Tropfpräparate

Der Aufwand für die Tropfpräparation ist wesentlich geringer; die Anwendung dieser Technik ist für die Analyse der "Flächengitter" zweckmäßig.

Von dem suspendierten Untersuchungsmaterial wird eine kleine Verdünnungsreihe hergestellt. Man läßt die Suspensionen auf befilmte Trägernetze tropfen und antrocknen. Dabei lagern sich die Thylakoide, wenigstens teilweise, flächig ab. Die "Flächengitter" werden so einer quantitativen Untersuchung zugänglich.

Negativkontrastierung

Negativ-staining, bzw. Negativkontrastierung liegt vor, wenn Tropfpräparate circa dreißig Sekunden 0.5%iger Phosphorwolframsäure ($H_3PW_{12}O_{40} \cdot 24 H_2O$) ausgesetzt werden.

Bei dieser schonenden Methode dringt die kontrastgebende Schwermetalllösung in die Lücken der darzustellenden biologischen Struktur ein. Diese Struktur erscheint dadurch im Elektronenmikroskop als kontrastarmes Negativ.

Platin/Kohlenstoff - Bedampfung

Eine andere Methode zur Kontraststeigerung bei Tropfpräparaten besteht darin, sie in einem Vakuum von etwa 10^{-6} Torr unter einem Winkel von 10° bis 30° mit Platin und Kohlenstoff zu bedampfen. Es resultiert eine dünne, absorptionssteigernde und Elektronen streuende Aufdampfschicht von hoher Dichte aber geringer Eigenstruktur (18).

1) Formvar - Polyvinyl Formal der Shawinigan Ltd., London

Gefrierätzung

Das Untersuchungsmaterial wird mit Glycerin als Gefrierschutzmittel versetzt und in Form dicker Tropfen auf Silberträger aufgebracht. In mit flüssigem Stickstoff gekühltem Freon 22 (CHFCl_2) wird es mit einer Gefriergeschwindigkeit von mehreren hundert Grad pro Sekunde auf -150°C abgekühlt (15).

In einer Gefrierätzapparatur wird das Präparat auf 173°K erwärmt und mit einer Stahlklinge angebrochen, deren Temperatur bei -180°C liegt. Bei 10^{-6} Torr stellt man dann die Klinge drei bis fünf Millimeter über das Präparat. Im Verlauf von etwa drei Minuten sublimiert eine dünne Eisschicht von der Bruchfläche ab und die zu untersuchende Struktur wird reliefartig freigelegt.

Durch Bedampfen mit Platin und Kohlenstoff wird ein Abdruck der freigelegten Struktur hergestellt, der nach Entfernen und Reinigung von Eisresten und anhaftendem organischen Material mikroskopiert werden kann.

Die anhand der Gefrierätztechnik gewonnenen Abdrucke geben Auskunft über den Aufbau der Thylakoidstapel und über die Flächenstruktur dieser Membranen. - Die nicht angebrochenen Bakterien bleiben bei Anwendung dieser Präparation latent lebensfähig.

Visuelle Auswertung und Ergebnisse

Die Auswertung von je fünfzig, nach Anwendung der skizzierten Präparationsmethoden erhaltenen, nachvergrößerten elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde zunächst visuell durchgeführt (GIESBRECHT, 6). Das erfolgte unter einer schwach vergrößernden Lupe. Verwendung fand ein Glaslineal mit Halbmillimeterteilung, so daß sich Zehntelmillimeter gut schätzen ließen.

Die Mittelwerte dieser Serienauswertungen wurden nach Präparationsmethode und Aussage aufgegliedert. Sie sind

einschließlich der Standardabweichungen in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Mittelt man über die einzelnen Präparationsmethoden, so ergeben sich, auf ganze Å und Winkelgrade aufgerundet, folgende Werte für die Identitätsperiode in Richtung der Stapelnormalen B, die beiden Richtungen des "Flächengitters" a und c sowie für den von a und c eingeschlossenen Winkel β :

Stapelnormale	B = 186 Å
"Flächengitter"	a = 118 Å
	c = 121 Å
Winkel ($a \rightarrow c$)	$\beta = 119^\circ$

Die Standardabweichung ist maximal $s = \pm 11$ Å bzw. für β $s = \pm 4^\circ$. - Der Wert dieser Aussage wird in Abschnitt C und auch im Anhang ausführlich diskutiert.

Optische Diffraktion

Die relativ große Standardabweichung bei der visuellen Auswertung elektronenmikroskopischer Aufnahmen zeigt, daß eine Verbesserung der Auswertemethoden angebracht ist. Werden so hochgeordnete Strukturen untersucht, wie die Thylakoide von *Rhodospseudomonas viridis*, dann führt die Anwendung der optischen Diffraktion zu dieser Verbesserung.

Experimentelle Anordnungen, die auf der parallelen Beleuchtung nach FRAUNHOFER beruhen, sind von KLUG, BOSECK und THON konzipiert worden. Dabei ist das Einhalten der parallelen Beleuchtung mit großem Aufwand verbunden. Es ist nie exakt zu erreichen, da die Bestrahlungsapertur von der Ausdehnung der Lichtquelle abhängig ist. Eine ideal punktförmige Lichtquelle läßt sich aber nicht realisieren.

Der experimentelle Aufwand ist erheblich zu reduzieren, wenn man von der parallelen Beleuchtung abgeht und

mit konvergentem Licht arbeitet (FRESNEL). Will man dann trotzdem wie bei der Auswertung der FRAUNHOFER-Beugung verfahren, so muß die Bestrahlungsapertur klein sein gegen die am Objekt (Photoplatte) auftretenden Beugungswinkel.

Ein einfaches Laser-Diffraktometer

Ausgehend von der THON'schen Anordnung gelang es, eine Diffraktometer-Konstruktion zu verwirklichen, die den theoretischen Bedingungen gerecht wird. Die quantitative Auswertung elektronenmikroskopischer Aufnahmen konnte dadurch erheblich verbessert werden.

Abbildung 7b zeigt den realen Aufbau des Diffraktometers, Abbildung 7a gibt eine schematische Darstellung.

Mit einem Helium/Neon-Laser (1) wird kohärentes Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 6328 \text{ \AA}$ erzeugt. Durch den Kondensor (2) wird es auf die Blende (3) fokussiert. Diese Blende hat eine freie Öffnung von nur $5 \mu\text{m}$; sie ist die eigentliche Lichtquelle des Systems. Das von ihr ausgehende Licht wird von der Beleuchtungslinse (4) in der Beugungsebene (6) gebündelt. Dort entsteht das scharfe Beugungsbild des zu analysierenden Objektes (5), also der elektronenmikroskopischen Originalaufnahme. Die Durchmesser der Beugungsbilder liegen im Bereich von wenigen Millimetern und lassen sich nur mühsam vermessen. Mit Hilfe des Objektives (7) wird deshalb nachvergrößert. In der Registrierebene (8) wird das Beugungsbild schließlich auf Film festgehalten.

Beim Bau dieses Diffraktometers wurden, soweit irgend möglich, handelsübliche Teile verwendet. Der Helium/Neon-Laser LG 64 von Siemens/Erlangen (1), ein Mikroskopheiztisch-Objektiv H 32x, Apertur 0.60 aus Quarzglas von Leitz/Wetzlar als Kondensor (2), ein elektro-

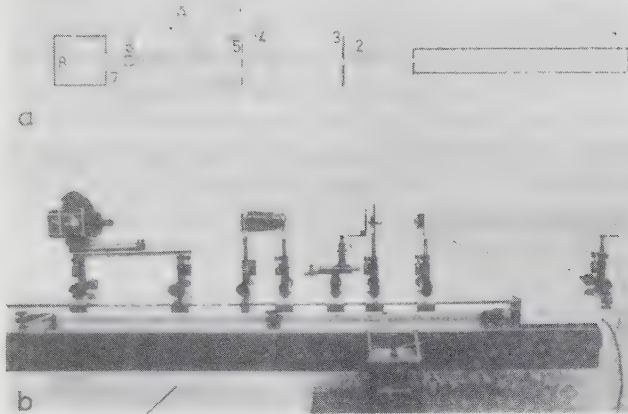


Abb. 7: Laser-Diffraktometer zur quantitativen Auswertung elektronenmikroskopischer Aufnahmen. a-schematische Darstellung, b-realer Aufbau.

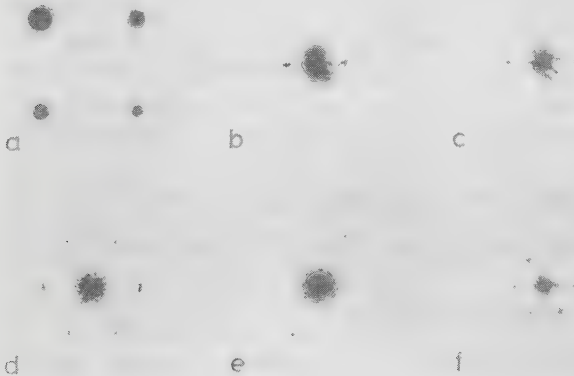


Abb. 8: Laser-Diffraktogramme. a-Kupfernnetz mit 0.1268 mm Maschenweite, b-von einem Thylakoidstapel aus einer Dünnschnitt-Aufnahme, c-von einem Thylakoidstapel aus einer Gefrierätz-Aufnahme, d-vom Thylakoid-"Flächengitter" aus einer Gefrierätz-Aufnahme, e-vom Thylakoid-"Flächengitter" aus einer Aufnahme nach Negativkontrastierung, f-vom Thylakoid-"Flächengitter" aus einer EM-Aufnahme nach Anwendung der Pt/C-Bedampfung.

nenmikroskopischer Präparatträger aus Platin mit einer $5\text{ }\mu\text{m}$ Bohrung als Blende (3), ein Leica-Teleobjektiv mit 200 mm Brennweite als Beleuchtungsobjektiv (4) und zur Registrierung der Beugungsdiagramme eine Rolleiflex SL 66 (8), deren Normalobjektiv zur besseren Nachvergrößerung gegen ein Zeiss-Luminar 1:2.5 (7) ausgetauscht wurde. Die optische Bank, die Verschiebereiter und der Objekthalter sind aus dem Programm der Lehrmittelwerkstätten von Spindler und Hoyer/Göttingen.

Da die Registrierung der Beugungsbilder Belichtungszeiten bis zu einigen Sekunden erfordern kann, ergaben sich durch Gebäudeschwingungen zunächst Komplikationen. Ein rechteckiger, zur Dämpfung der Eigenschwingungen ausgeschäumter Stahlträger (9) schaffte Abhilfe; er ruht auf vier Schraubenfedern mit einer Eigenfrequenz von zwei Hertz. Auf ihm wurde das Diffraktometer-System aufgebaut.

In Abbildung 8 a-f sind sechs typische Diffraktometer-Diagramme wiedergegeben, die mit diesem Gerät erhalten wurden. Sie wurden von den Originalaufnahmen der Abbildungen 1, 24, 25, 23 und 21 registriert.

Auswertung der Laser-Diffraktogramme

Die Auswertung erfolgt mit Hilfe der BRAGG'schen Gleichung:

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d' \cdot \sin \vartheta \quad (a)$$

Dabei legt $n = 1, 2, 3, \dots$ die Beugungsordnung fest. $\lambda = 6328\text{ \AA}$ ist die Wellenlänge des verwendeten kohärenten, monochromatischen Lichtes, d' der Abstand im Objekt und ϑ der Beugungswinkel, unter dem das Licht an der elektronenmikroskopischen Platte (Objekt) gebeugt wird. Dieser Beugungswinkel muß aus den Beugungsdiagrammen bestimmt werden.

Der Winkel ϑ ist sehr klein, sodaß man $\sin \vartheta = \tan \vartheta = \vartheta$ setzen kann. Die Strecke zwischen zwei symmetrisch zum Primärstrahl angeordneten Reflexen erster Ordnung D [mm] wird um den Faktor der optischen Nachvergrößerung V_{opt} zu groß gemessen. Ist A [mm] der Abstand vom Objekt zur Beugungsebene, so ergibt sich der Beugungswinkel ϑ aus

$$\vartheta = \frac{D}{\lambda \cdot V_{\text{opt}} \cdot A} \quad (b)$$

Der Winkel ϑ wird in (a) eingesetzt und man erhält für den Abstand d' im Objekt (Photoplatte)

$$d' = \frac{n \cdot 2 \cdot \lambda \cdot A \cdot V_{\text{opt}}}{D} \quad (c)$$

Der Abstand im Objekt d' ist aber nichts anderes, als die mit dem Faktor der elektronenmikroskopischen Vergrößerung V_{elektr} behaftete Identitätsperiode d der zu analysierenden Struktur.

$$d' = d \cdot V_{\text{elektr}} \quad [9]$$

Aus den Diffraktogrammen ist diese Identitätsperiode d also nach

$$d = \frac{n \cdot A \cdot V_{\text{opt}}}{D \cdot V_{\text{elektr}}} \cdot 12\,656 \text{ [Å]} \quad (d)$$

zu berechnen.

Gleichung (d) gibt die Beziehungen zwischen den Versuchsparametern V_{elektr} , V_{opt} und A wieder. Ihre Anwendung bei der Serienauswertung von Diffraktogrammen ist jedoch nicht zweckmäßig. V_{opt} und A müssen, wenn man mit dieser Gleichung arbeiten will, konstant gehalten werden. Das läßt sich für A nicht durchführen, denn durch die Veränderung

von A wird der Bereich der Mikroskopplatte beeinflusst, der ausgewertet werden soll.

Bei Serienauswertungen ist es daher sinnvoll, sich auf ein in seinen Gitterwerten bekanntes Vergleichsobjekt zu beziehen. Als Vergleichsgitter wurde hier ein Kupfernetz mit quadratischen Maschen verwendet. Die Maschenweite $d_{Cu} = 0.1268 \cdot 10^7 \text{ \AA}$ wurde unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Abbildung 8a zeigt einen Ausschnitt von dem Diffraktogramm dieses Kupfernetzes.

Verfährt man bei der Anwendung des Diffraktometers auf diese Weise, so ist die Identitätsperiode nach

$$d = \frac{D_{Cu} \cdot 0,1268 \cdot 10^7}{D \cdot V_{\text{elektr}}} [\text{\AA}] \quad (e)$$

zu errechnen. Diese Gleichung ist leicht zu erhalten, wenn man die Daten für das Kupfernetz in (d) einsetzt und die unveränderte Beziehung (d) durch die substituierte dividiert.

Ergebnisse der Auswertung elektronenmikroskopischer Aufnahmen mit dem Laser-Diffraktometer

In der oben beschriebenen Weise wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen mit dem Diffraktometer ausgewertet. Die Einzelergebnisse sind in Tabelle 1 in der gleichen Anordnung wie bei der visuellen Auswertung zusammengestellt.

Auch hier wurde über die vier verschiedenen Präparationsmethoden gemittelt. Als Mittelwerte für die Parameter der Thylakoidstapel werden erhalten:

Stapelnormale	B = 167 $\text{\AA}$
"Flächengitter"	a = 103 $\text{\AA}$
	c = 107 $\text{\AA}$
Winkel (a $\rightarrow$ c)	$\beta = 119^\circ$

Die Standardabweichung beträgt hier maximal $s = \pm 6 \text{\AA}$,

bzw. für den Winkel β $s = \pm 4^{\circ}$. Bei der visuellen Bestimmung von a , c und B war eine Standardabweichung von $s = \pm 11 \text{ \AA}$ berechnet worden. - Dies zeigt deutlich, daß die Anwendung des Laser-Diffraktometers eine wesentlich genauere Auswertung elektronenmikroskopischer Aufnahmen ermöglicht.

Tabelle 1: Elektronenmikroskopische Daten für die Stapelung und das "Flächengitter" der Thylakoide. Im oberen Teil sind die visuell, im unteren Teil die mittels der optischen Diffraction bestimmten Werte mit ihren Standardabweichungen angegeben. In () ist die Zahl n der Einzelmessungen festgehalten. Anm - Angabe nicht möglich.

Präparationsmethode	Stapelung B	"Flächengitter" a		Winkel β	
		c			
Dünnschnitttechnik	147±21 Å (50)	Anm	Anm	Anm	
Tropfpräparate					
Negativkontrastierung	Anm	108± 9 Å (50)	113± 9 Å (50)	120°±3° (20)	
Pt/C-Bedampfung	Anm	114± 9 Å (50)	115± 7 Å (50)	118°±3° (20)	
Gefrierätzung	224±25 Å (50)	131±10 Å (50)	136±11 Å (50)	119°±4° (20)	
Dünnschnitttechnik	134±16 Å (12)	Anm	Anm	Anm	
Tropfpräparate					
Negativkontrastierung	Anm	100± 6 Å (20)	107± 6 Å (20)	119°±4° (25)	
Pt/C-Bedampfung	Anm	97± 5 Å (30)	100± 5 Å (30)	120°±3° (29)	
Gefrierätzung	200± 9 Å (23)	111± 3 Å (20)	113± 3 Å (20)	119°±2° (19)	

3. Röntgenographische Analyse

Zur Untersuchung so hoch geordneter biologischer Strukturen, wie sie die Thylakoide von *Rhodopseudomonas viridis* darstellen, bietet sich neben der Elektronenmikroskopie eine andere, völlig selbständige Untersuchungstechnik an: Die Beugung von Röntgenstrahlen. Sie beruht darauf, daß monochromatische Röntgenstrahlen an derartigen geordneten Strukturen gesetzmäßig gebeugt werden. Die Strukturbestimmung wird anhand der Beugungsdiagramme mit mathematischen Mitteln durchgeführt.

Derartige Untersuchungen sind von KREUTZ (12) an Spinatchloroplasten und von PAPE an den bläschenförmigen Thylakoiden von *Rhodopseudomonas spheroidis* (16) durchgeführt worden. Beide Autoren werten die Beugungsintensitäten aus und schließen auf die Geometrie der untersuchten biologischen Struktur zurück. Im Gegensatz dazu wird in dieser Arbeit versucht, die Geometrie des Thylakoidgitters auf direktem Wege zu bestimmen.

Röntgenpräparation

Die Thylakoide liegen nach der Isolierung mit wenig Wasser vermenget vor. Sie werden auf einem Objektträger ausgestrichen und trocknen an. Da es sich um flächige Gebilde handelt, wäre zu hoffen, daß sie sich dabei übereinander schichten. Es würden sich dann auf den Beugungsdiagrammen intensivere Beugungsmaxima, eventuell aber sogar Textureffekte ergeben. Für die Auswertung der Diagramme wäre beides vorteilhaft.

Auch sehr dünne gläserne Objektträger werden von Röntgenstrahlen nur schlecht durchdrungen. Die angetrockneten Thylakoide müssen deshalb, z.B. mit einer dünnen Klinge, gelöst werden. Die beim Antrocknen unter Umständen entstandene Ordnung wird dabei mindestens teilweise zerstört. Kommen die Thylakoide anschließend zur röntgenographischen Untersuchung in Lithium-

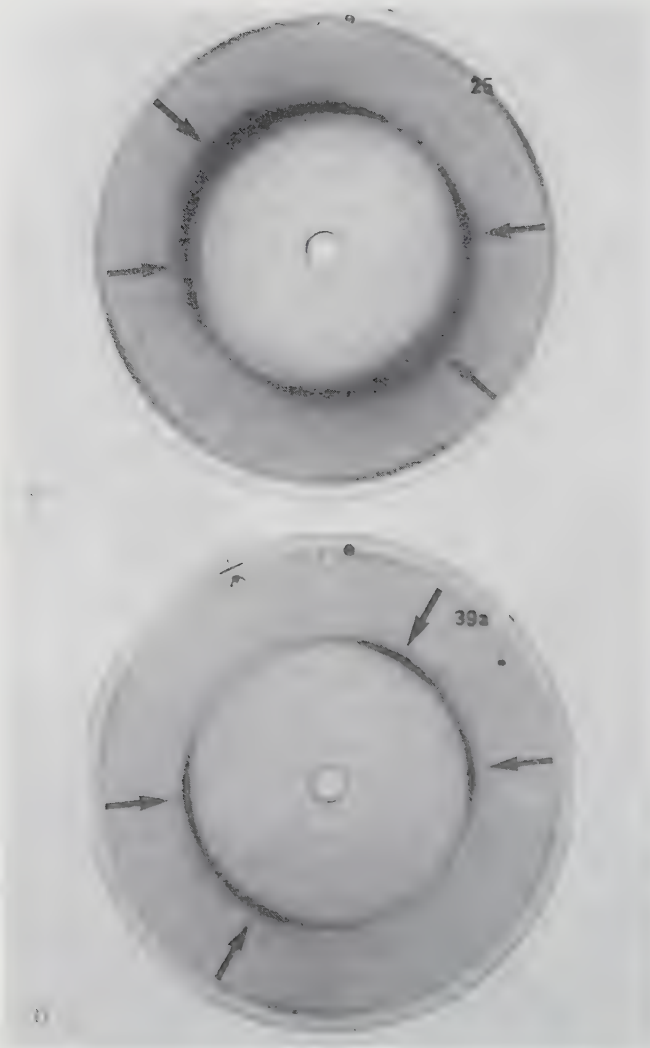


Abb. 9: a - Röntgendiagramm einer 20 μm dicken Hostaphanfolie. b - Diagramm einer nur 3.5 μm dicken Hostaphanfolie. Kiessig-Kamera, Cu-Strahlung. Beugungsmaxima und Textureffekte (Pfeile) sind nicht zu übersehen.

boratglas-Kapillaren (keine Eigenstruktur, minimales Absorptionsvermögen für Röntgenstrahlen), so wird dieser Zerstörungsprozess fortgesetzt.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, die vom Objektträger gelösten Thylakoide in dünne Kunststoffolien zu rollen. Auch diese Methode hat einen großen Nachteil: Es gibt keine Kunststoffolien ohne Interferenzmaxima im Kleinwinkelbereich. Abbildung 9a zeigt das Beugungsdiagramm einer 20 μm dicken Hostaphanfolie, deren stärkste Beugungslinie einen d-Wert von 5.4 Å hat und die außerdem deutlich Textureffekte (Pfeile) aufweist. Selbst eine nur 3.5 μm dicke Folie zeigt deutlich Beugungslinien und Texturen (Abb. 9b). Die rechnerische Eliminierung dieser Erscheinungen, die verfälschen die Beugungsdiagramme der zu untersuchenden biologischen Struktur, ist aufwendig.

Ein spezielles Präparationsverfahren

Mit dem Ziel, im Durchstrahlungsbereich trägerfreie Präparate zu erhalten, wurden besondere Präparatträger und ein geeignetes Präparationsverfahren entwickelt: Abbildung 10 zeigt die aus Plexiglas hergestellten Präparatträger und weitere Hilfsmittel. Drei verschiedene Präparatträgertypen sind mit (1), (2) und (3) gekennzeichnet. Davon dient (1) ausschließlich für Untersuchungen in der Kiessig-Kamera, (2) kann außerdem in der Kratky-Kamera verwendet werden und (3) erlaubt die Justierung von Kapillar-Präparaten auf dem Original-Präparatträger der Kiessig-Kamera. Diese drei Trägertypen ermöglichen es außerdem, die Röntgenpräparate nach Beendigung der Aufnahmen unzerstört aufzubewahren.

Präparatträger (1) besteht aus einer 4.5 mm dicken Plexiglasscheibe mit einem Außendurchmesser von 30 mm. Die zentrale Bohrung von 5 mm nimmt das Präparat auf;

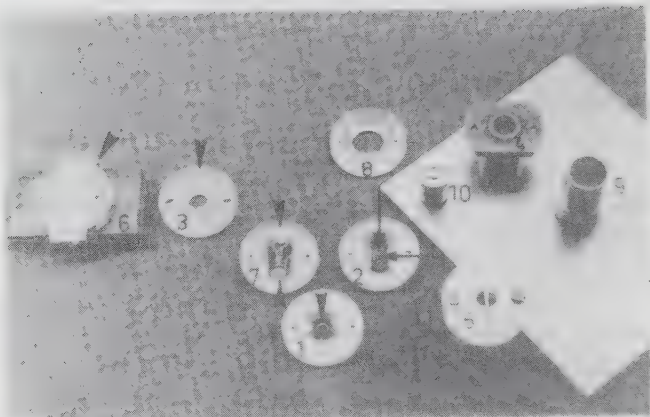


Abb. 10: Verschiedene Hilfsmittel zur Präparation von biologischem Material für die röntgenographische Analyse (Einzelheiten vgl. im Text S.21 bis 24).

sie ist unter einem Winkel von 90° soweit abgesenkt, daß ein 0.5 mm breiter, senkrechter Rand erhalten bleibt (Pfeil). Präparatsträger (2) weist die gleichen Abmessungen auf, nur ist die zentrale Bohrung durch einen 5 mm breiten und 12 mm langen Spalt ersetzt, der senkrecht zu den Bohrungen für die Befestigungsschrauben (Pfeile) verläuft. Bei (3) beträgt der Durchmesser der Mittelbohrung 8 mm: Ein Kapillar-Präparat wird in der 1.5 mm tiefen und 1.5 mm breiten Nut (Pfeil) mit Bienenwachs (schmilzt leicht und erstarrt schnell) so eingeklebt, daß die Verbindungslinie durch die beiden Bohrungen für die Befestigungsschrauben senkrecht auf der Kapillar-Achse steht.

In (1) und (2) wird das Untersuchungsmaterial folgendermaßen eingebracht: Der Präparatsträger wird auf eine Plexiglasunterlage (6) so aufgeschraubt, daß Bohrung oder Spalt nach unten von einer Kunststoffolie, die

auf einem Gummistreifen liegt (Pfeil), abgedichtet wird. Danach tropft man das Untersuchungsmaterial in die Bohrung oder den Spalt und läßt es bei etwa 12 Torr über Kieselgel antrocknen. Der 0.5 mm hohe, senkrechte Rand ist rauher als die gesamte Umgebung: Hier haftet das Untersuchungsmaterial am besten. Lockert man nach dem Antrocknen die Befestigungsschrauben zunächst nur leicht, dann kann man die Kunststoffolie herausziehen und erhält so ein im Durchstrahlungsreich trägerfreies Röntgenpräparat (6). Es kann im Präparatträger an den Enden des Spaltes zusätzlich durch Bienenwachströpfchen verklebt werden (7).

Zur Registrierung der Beugungsdiagramme werden diese Präparate auf dem Original-Präparatträger (4) der Kiessig-Kamera aufgeschraubt. Durch eine Distanzscheibe sind sie von ihm getrennt. Die Nuten in dieser Scheibe (8) sorgen dafür, daß auch das Blendensystem der Kamera einwandfrei evakuiert werden kann.

Bei dem Präparatträger für Kapillar-Präparate sind die Bohrungen für die Befestigungsschrauben 1.5 mm bis 2 mm größer, als die Durchmesser der Schrauben. Sollen nämlich Kapillar-Präparate untersucht werden, so müssen sie mit einer Genauigkeit von ± 0.1 mm vor der letzten Blende des Blendensystems justiert werden. Dazu ist senkrecht auf einer durchbohrten Messingplatte eine Halterung (9) für den zum Präparat hin liegenden Teil des Blendensystems (10) als Justierhilfe montiert. Setzt man (10) in (9) ein und schiebt den Original-Präparatträger (4) darüber, auf dem die Röntgenpräparate wie beschrieben befestigt sind, so liegen die gleichen Präparat/Blenden-Verhältnisse wie in der Kamera vor. Da die Grundplatte gegen den Arbeitstisch eines Präparationsmikroskopes^{+) ausgetauscht wer-}

+) Hier wurde ein stereoskopisches Binokularmikroskop der Firma Leitz/Wetzlar verwendet.

den kann, ist es möglich, die exakte Justierung der Präparate unter dem Mikroskop vorzunehmen. Die grossen Bohrungen für die Befestigungsschrauben bieten den dafür notwendigen Spielraum.

Aufnahmetechnik

Zur röntgenographischen Untersuchung der Thylakoidstruktur standen zwei Kiessig-Kameras zur Verfügung. Diese Kameras ermöglichen es, Röntgenintensitäten bis zu einem BRAGG-Winkel von 10° zu erfassen. Sie sind einschliesslich Blendensystem evakuierbar, sodaß die Streuung der Röntgenstrahlen an Luft vermieden und organisches Material unter Verwendung einer Cu-Fein-fokusröhre untersucht werden kann. Der Präparat/Film-Abstand beträgt 100 mm, 200 mm oder 400 mm. Diese Kameras erlauben es, auch Beugungsvorgänge nahe am Primärstrahl zu analysieren.

Als Vakuumsicherung haben diese Kameras normalerweise vor dem Blendensystem eine $20\text{ }\mu\text{m}$ dicke Kunststoffolie. Diese Folie absorbiert Röntgenstrahlen annähernd so stark, wie eine 80 mm dicke Luftschicht. Diese Folie wurde gegen das Nickelblättchen ausgetauscht, das bei Verwendung einer Kupferröhre zur Filterung der Cu- k_β -Wellenlänge sonst zusätzlich hinter dem Strahlenaustrittsfenster der Röntgenröhre angebracht ist. Diese Änderung hatte eine spürbare Verkürzung der Belichtungszeiten zur Folge.

Die symmetrischen Beugungsdiagramme wurden photographisch registriert (Agfa-Gevaert, Dentus T₂). Die Entwicklung der Röntgenfilme erfolgte bei 20°C in einem Feinkorn-Tankentwickler (Tetenal, Medional). Um Veränderungen der Filmschicht durch den Entwicklungsprozess berücksichtigen zu können, wurden die Röntgenfilme vor der Belichtung in Richtung des Film-Meridians mit zwei Eichmarken versehen: Der Abstand von

Markierung zu Markierung beträgt $90.47 \text{ mm} \pm 0.01 \text{ mm}$. Mit diesen Mitteln wurden 96 Beugungsdiagramme der Thylakoidstruktur von etwa 25 verschiedenen Präparaten registriert. Die Belichtungszeiten lagen zwischen zwölf und zweihundert Stunden. Die Abbildungen 11a und 11b zeigen zwei dieser Aufnahmen; sie wurden bei Präparat/Film-Abständen von 100 mm und 200 mm registriert.

Auswertung

Die Thylakoidstruktur verursacht eine Folge von 53 mehr oder weniger verwaschenen Debye-Ringen. Die von der Präparation erhoffte sekundäre Stapelung der Thylakoide kann nicht stattgefunden haben; es treten keine Textureffekte auf. Auch in den besonderen Präparatsträgern liegen die Thylakoide ungeordnet als Pulverpräparat vor. Die Beugungsdiagramme stellen also normale Debye-Scherrer Diagramme dar, die mit einer Flachkamera registriert wurden.

Die Auswertung wurde zunächst mit einem Densitometer durchgeführt. Das Gerät gibt die Lage mittelstarker und starker Debye-Ringe korrekt an. Mit dem Auge noch gut sichtbare sehr schwache bis schwache Reflexe werden jedoch nicht eindeutig aufgelöst. Das hat verschiedene Ursachen:

1. Wie die Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigt, sind die Parameter der Thylakoidstruktur sehr groß. Dies bedeutet, daß die ersten Beugungsmaxima sehr nahe am Primärstrahl registriert werden.
2. Nahe am Primärstrahl weist eine kontinuierliche Streukurve, die von der Form der streuenden Teilchen hervorgerufen wird, ihre höchste Intensität auf. Sie wird zwangsläufig gleichzeitig aufgenommen.

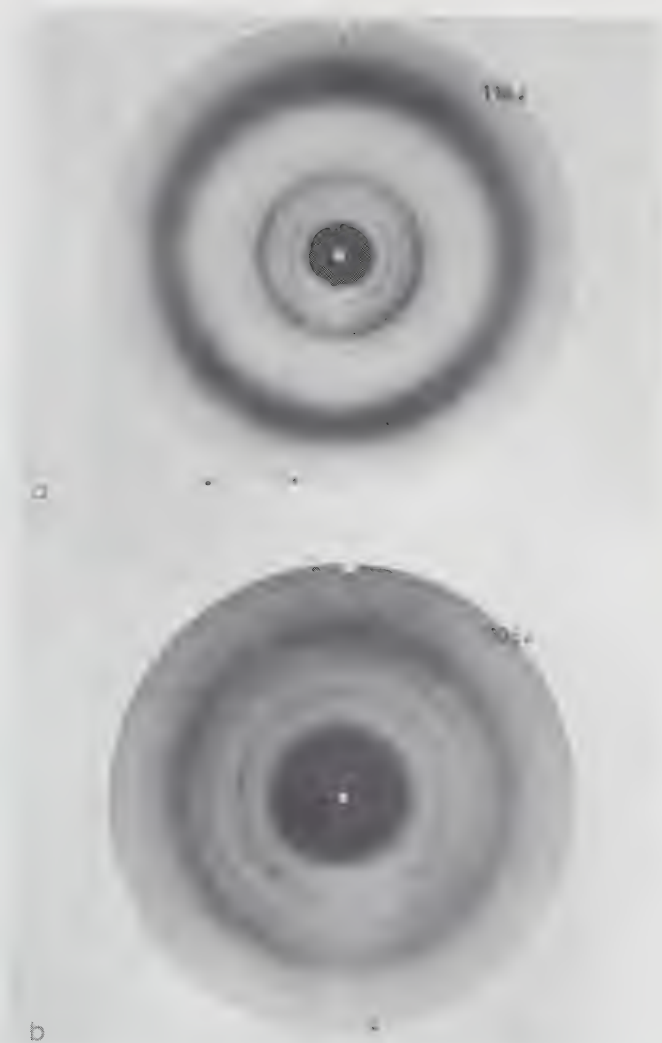
3. Die Schärfe der Beugungsmaxima hängt von der Grösse der streuenden Bereiche der Thylakoidstruktur ab. Sind diese Bereiche, wie hier, kleiner als 10^{-4} mm, so werden breite, verwaschene Beugungsmaxima registriert (10).

Dadurch wurde das Ausmessen der Beugungsdiagramme der Thylakoidstruktur außerordentlich erschwert.

Um eine Aussage zu erhalten, wurden die 96 registrierten Beugungsdiagramme ohne Rücksicht auf subjektive Fehler vermessen und d-Werte berechnet. Beim Ordnen dieser d-Werte ergaben sich Gruppen, die so dicht beieinander liegende Werte umfaßten, daß diese ein und derselben Debye-Linie zugeordnet werden konnten. Aus diesen Gruppen wurden Mittelwerte berechnet. Die so erhaltenen Gruppen-d-Werte sind in Tabelle 2 wiedergegeben und in Abbildung 12 graphisch dargestellt. Diese Folge von d-Werten ist ein erstes Charakteristikum der Thylakoidstruktur. Ohne weitere Überlegungen sind die Konstanten der Thylakoidstruktur daraus jedoch nicht abzuleiten.

Die quantitative Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigt (Tabelle 1), daß der Stapelparameter bei $200 \text{ \AA}$, die Parameter des "Flächengitters" bei annähernd $100 \text{ \AA}$ liegen. Sind Stapelung und "Flächengitter" unabhängig voneinander, so enthalten die Röntgendiagramme nebeneinander Debye-Ringe, die von der Stapelung hervorgerufen wurden und andere, die vom "Flächengitter" verursacht wurden. Tabelle 2 gibt dann neben den d-Werten für die Stapelung die für das "Flächengitter" wieder. Liegt dagegen ein dreidimensionales Thylakoidgitter vor, so beziehen sich alle d-Werte auf diese räumliche Struktur.

Der Hinweis auf ein dreidimensionales Thylakoidgitter wurde mit Hilfe der Polarisationsmikroskopie erhalten. Im konoskopischen Strahlengang zeigen die Thy-



125, 111 Röntgenbeugungsdiagramme der Thylakoide von *Rhodospseudomonas viridis*, Eleonig-Kamera, Cu-Strahlung. a - Präparat/Film-Abstand 100mm, b - Präparat/Film-Abstand 200 mm.

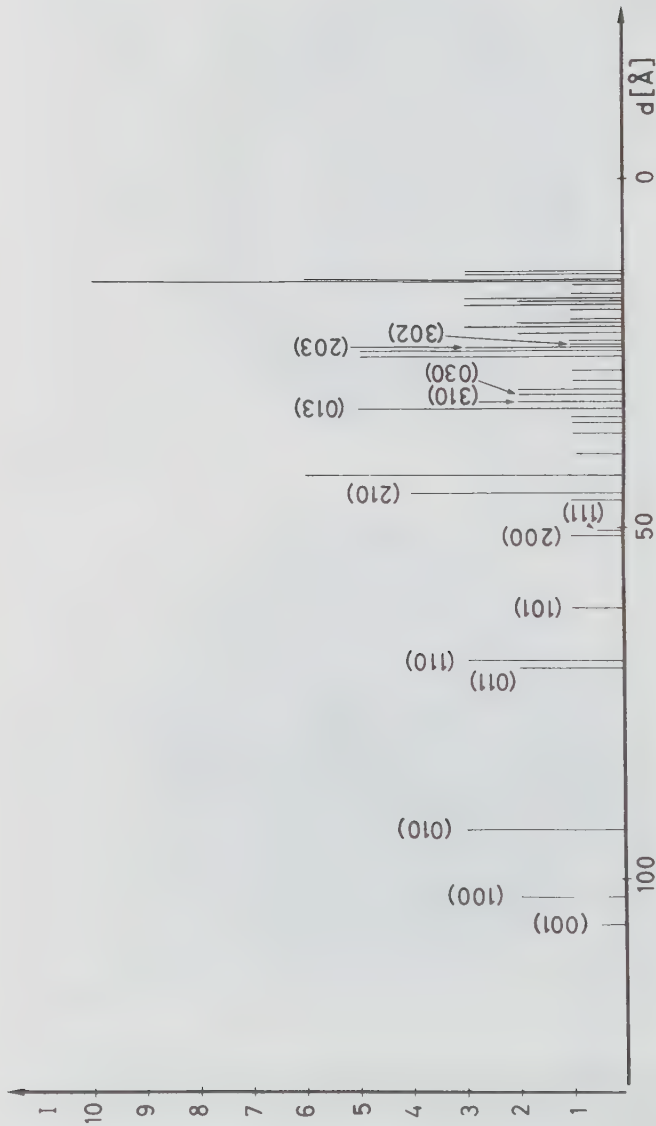


Abb. 12: Graphische Darstellung der Interferenzmaxima der Thylakoidstruktur. Auf die nicht indizierten d-Werte entfallen zwei oder mehr Index-Tripel. Einzelheiten geben die Tabelle 2 wieder. I - geschätzte, relative, integrale Intensitäten.

Tabelle 2: Geschätzte relative Intensitäten I, gemessene d-Werte und zugeordnete monokline Indizes hkl. In () sind die aus den ermittelten a, b, c und β anhand der für das monokline Kristallsystem gültigen quadratischen Form der BRAGG'schen Gleichung rückgerechneten d-Werte angegeben.

Nr.	I	a [Å]	hkl und (rückgerechnete d-Werte)
1.	1	164.31	
2.	1	143.99	
3.	2	136.32	
4.	1	109.82	
5.	0.5	106.51	001 (105.94)
6.	2	102.77	100 (102.87)
7.	3	93.03	010 (92.80)
8.	2	69.91	011 (69.77)
9.	3	69.09	110 (68.88)
10.	5	67.98	
11.	4	65.76	
12.	4	63.35	
13.	1	61.34	101 (60.57)
14.	1	53.54	
15.	1	51.25	200 (51.39)
16.	0.5	50.46	111 (50.68)
17.	1	49.74	

Nr.	I	d	[λ]	hkl und (rückgerechnete d-Werte)
18.	1	46,08	020 (46,40)	012 (45,95)
19.	4	43,13	210 (44,95)	
20.	1	43,13		
21.	6	42,35	120 (42,29)	021 (42,49)
22.	0,5	41,53		
23.	1	40,52		
24.	1	39,58	201 (39,35)	102 (39,84)
25.	1	36,54	112 (36,60)	211 (36,82) 121 (36,21)
26.	1	35,06	003 (35,27)	022 (34,88)
27.	1	34,19	300 (34,26)	220 (34,44)
28.	1	33,76		
29.	5	32,84	013 (32,96)	
30.	2	31,97	310 (32,14)	
31.	2	31,16	030 (30,93)	
32.	2	30,37	202 (30,25)	221 (30,00) 122 (30,22)
33.	1	28,97	103 (29,27)	301 (28,77) 212 (28,76)
34.	1	27,51	311 (27,47)	113 (27,92) 320 (27,56)
35.	5	25,61	400 (25,69)	014 (25,43) 222 (25,34)
36.	5	24,74	410 (24,76)	321 (24,44) 123 (24,76)

Nr.	I	d	[λ]	hkl und (rückgerechnete d-Werte)			
37.	3	24.22	203 (24.13)				
38.	1	23.75	302 (23.94)				
39.	1	23.34	040 (23.20)	104 (23.06)	312 (23.18)	213 (23.35)	
40.	2	22.13	401 (22.58)	114 (22.38)	411 (21.94)		
41.	3	21.22	005 (21.16)	322 (21.28)	223 (21.41)		
42.	2	20.70	500 (20.55)	015 (20.63)	124 (20.65)		
43.	1	20.13	303 (20.17)	204 (19.91)	402 (19.67)	510 (20.07)	
44.	1	18.84	050 (18.56)	105 (18.99)	501 (18.56)	115 (18.60)	323 (18.49) 520 (18.79)
45.	3	18.10	511 (18.20)	422 (18.11)	224 (18.30)		
46.	2	17.67	006 (17.63)	125 (17.57)			
47.	3	17.26	304 (17.27)	403 (17.18)	600 (17.13)	016 (17.32)	521 (17.23)
48.	1	16.62	205 (16.89)	502 (16.63)	215 (16.62)	512 (16.37)	610 (16.84)
49.	1	15.31	060 (15.47)	611 (15.52)			
50.	10	14.92	305 (15.04)	503 (14.89)	404 (15.12)	007 (15.11)	414 (14.93)
51.	6	14.72	206 (14.64)	700 (14.68)	602 (14.38)	513 (14.70)	315 (14.84)
52.	3	13.78	107 (14.01)	701 (13.67)			
53.	3	13.24	070 (13.26)	306 (13.28)	603 (13.11)	405 (13.44)	504 (13.39) 514 (13.25)

lakoide von *Rhodospseudomonas viridis* das Achsenbild eines optisch zweiachsigen Kristalls. Das aber ist charakteristisch für dreidimensionale orthorhombische, monokline oder triklin Strukturen.

Die Auswertung elektronenmikroskopischer Aufnahmen hat gezeigt, daß im "Flächengitter" ein von 90° und von 120° abweichender Winkel β auftritt. Wäre die Stapelnormale B die dritte Richtung des dreidimensionalen Thylakoidgitters, so müßte sie der monoklinen b -Achse entsprechen. Die a -Achse und die c -Achse würden dann in oder parallel zu der Ebene des "Flächengitters" liegen. Diese beiden Achsen schließen dann den monoklinen Winkel β ein.

Stimmt diese Arbeitshypothese, so müssen sich die d -Werte monoklin indizieren lassen. Dabei hängt es nur von der Reinheit der Röntgenpräparate ab, ob diese Indizierung bei allen Werten gelingt.

Rechnerische Bestimmung der Parameter des Thylakoidgitters

Grundlage der Berechnungen ist die BRAGG'sche Gleichung $\lambda = 2 \cdot d \cdot \sin \vartheta$. Dabei ist $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ die Wellenlänge der verwendeten Röntgenstrahlen, ϑ der Winkel, unter dem die Röntgenstrahlen an der Thylakoidstruktur gebeugt werden und d die Senkrechte vom Gitterursprungspunkt auf eine der Gitterebenen der Struktur.

Um die räumliche Lage solcher Gitterebenen eindeutig zu beschreiben, müssen drei Punkte angegeben werden. Die Gitterebenen schneiden die a -, b - und c -Achse der Struktur. Gibt man die Kehrwerte der Achsenabschnitte an, die sogenannten (hkl) , so ist die Lage der Gitterebenen exakt festgelegt.

Bei bekanntem Präparat/Film-Abstand ist der Winkel aus dem Durchmesser der Debye-Ringe zu bestimmen; $d [\text{\AA}]$

kann dann mit Hilfe der BRAGG'schen Gleichung berechnet werden. Zwischen d , den Indizes (hkl) , den Gitterparametern a_o , b_o , c_o und β besteht ein exakter Zusammenhang. Für eine monokline Struktur wird dieser Zusammenhang durch die Gleichung

$$d = \frac{1}{\sqrt{\frac{h^2}{a_o^2 \cdot \sin^2 \beta} + \frac{k^2}{b_o^2} + \frac{l^2}{c_o^2 \cdot \sin^2 \beta} - \frac{2hl \cdot \cos \beta}{a_o \cdot c_o \cdot \sin^2 \beta}}}$$

wiedergegeben.

Diese Gleichung bietet folgende Möglichkeit: Kennt man die Gitterparameter a_o , b_o , c_o und β mit einer Genauigkeit von etwa $\pm 1 \text{ \AA}$ bzw. $\pm 1^\circ$, so kann für ein Index-Tripel (hkl) der d -Wert rückgerechnet und mit dem experimentell ermittelten d -Wert verglichen werden. Abweichungen können durch schrittweise Veränderung der Gitterparameter beseitigt werden.

Die Größenordnung der Gitterparameter liegt als Ergebnis der Auswertung elektronenmikroskopischer Aufnahmen vor, die Indizes (hkl) der experimentell bestimmten d -Werte sind jedoch unbekannt.

Annäherung der Gitterparameter und Indizierung der d -Werte mit Hilfe des reziproken Gitters

Einen Ausweg bietet das sogenannte reziproke Gitter. Es ist im Anhang am Beispiel der Thylakoidstruktur ausführlicher beschrieben. Bei dieser theoretischen Konstruktion von GIBBS werden zur Beschreibung von Kristallstrukturen anstelle der reellen Gitterachsen deren reziproke Werte a^+ , b^+ und c^+ benutzt. Die Gitterebenen einer Struktur "schrumpfen" dann zu Punkten und bilden ein dreidimensionales Punktgitter, das die gleichen Eigenschaften wie das reelle Gitter hat.

Die Verbindungslinie vom Ursprung dieses reziproken Gitters zu einem seiner Gitterpunkte entspricht dem

reziproken d-Wert der Gitterebene des reellen Gitters, die durch diesen reziproken Gitterpunkt repräsentiert wird.

Damit bietet sich ein Weg, die Indizes (hkl) graphisch zu bestimmen und gleichzeitig die Gitterparameter soweit zu verbessern, daß sie mit der oben gegebenen Gleichung endgültig bestimmt werden können.

Zu diesem Zweck zeichnet man zunächst nur eine Ebene des reziproken Gitters: Die von a^+ und c^+ festgelegte Ebene. Trägt man auf a^+ die Strecken $1/a_0$, $2/a_0, \dots$ ab und zieht durch diese Punkte Parallelen zu c^+ , trägt man danach auf c^+ die Strecken $1/c_0$, $2/c_0$, $3/c_0, \dots$ ab und zieht durch diese Punkte Parallelen zu a^+ , so sind die Schnittpunkte dieser Linien die reziproken Gitterpunkte, also die "geschrumpften" Gitterebenen und man kann die Indizes (h0l) quasi ablesen (vgl. Abb. 13). Die Verbindungslinien zwischen dem Nullpunkt des reziproken Gitters und den indizierten Gitterpunkten sind aber $1/d$. Der Vergleich mit den experimentell bestimmten d-Werten zeigt, ob man richtig gezeichnet hat.

Die Parameter des reziproken Gitters müssen so lange variiert werden, bis, in den von der Zeichengenauigkeit gesetzten Grenzen, Übereinstimmung erzielt ist. In der von a^+ und c^+ beschriebenen Ebene des reziproken Gitters erhält man so die Indizes (h0l); gleichzeitig werden a_0 und c_0 sowie β merklich verbessert.

Die dritte Richtung des reziproken Gitters, nämlich b^+ , steht bei monoklinen Strukturen senkrecht auf der von a^+ und c^+ beschriebenen Ebene. Legt man nun im Abstand $1/b_0$ eine zweite reziproke Ebene über die erste mit den Indizes (h0l), so gibt sie Auskunft über die Indizes (h1l). Eine dritte Ebene, mit dem Abstand $2/b_0$ zur ersten, verrät die Indizes (h2l). Variiert man hier $1/b_0$ so lange, bis "reziproke und reelle d-Werte übereinstimmen", so erhält man schließlich auch

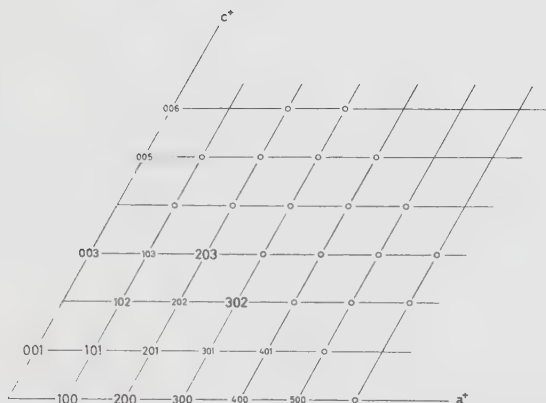


Abb. 13: Äquator des reziproken Gitters der Thylakoidstruktur mit den Indizes (h0l). Die Schriftgröße ist dem "Gewicht" der Index-Tripel angepaßt.

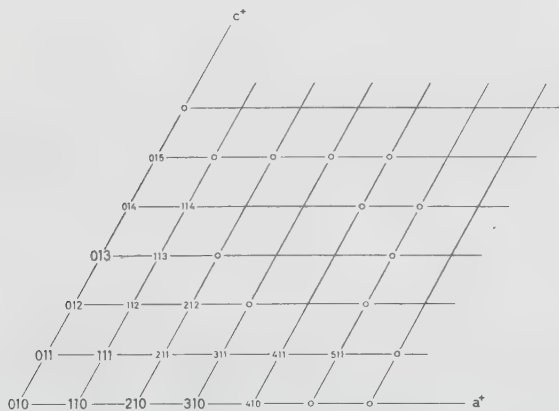


Abb. 14: Erste Schichtlinie des reziproken Gitters der Thylakoidstruktur mit den Indizes (h1l). Auch hier entspricht die Schriftgröße dem "Gewicht" der Index-Tripel.

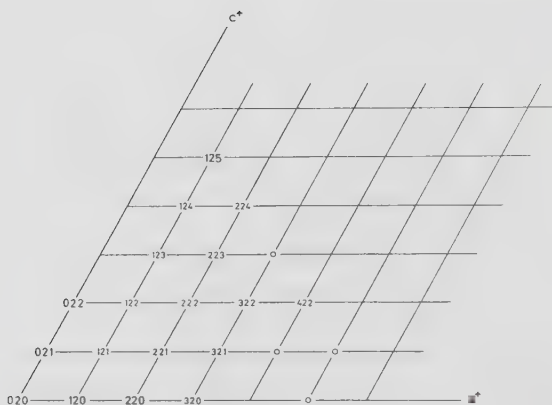


Abb. 15: Zweite Schichtlinie des reziproken Gitters der Thylakoidstruktur mit den Indizes (h2l).

den dritten Parameter des Thylakoidgitters. Die Gitterkonstanten a_0 , b_0 , c_0 und β sind damit so genau bekannt, daß sie mit Hilfe der angegebenen Gleichung in kleinsten Schritten ($0.1 \text{ \AA}$ und 0.1°) variiert werden können. Wenn zwischen den experimentell bestimmten und den rückgerechneten d-Werten die beste mögliche Übereinstimmung erreicht ist, kann das Verfahren abgeschlossen werden.

Intensitätsauswertung

Eine exakte Auswertung der Beugungsintensitäten erwies sich wegen der beschriebenen Überlagerungseffekte auf den Beugungsdiagrammen als unmöglich. Die relativen, integralen Intensitäten wurden visuell geschätzt und mit den Zahlen 1 bis 10 bewertet. Die Intensität "10" kommt dem Debye-Ring mit dem d-Wert $14.92 \text{ \AA}$ zu:

Er wurde als Sammelmaximum der Reflexe (305), (503), (404), (007) und (414) registriert (vgl. Tabelle 2). Auf die Intensität dieses Sammelmaximums beziehen sich die Schätzwerte. Die Intensitätsangaben können daher nur als grobe Annäherung angesehen werden.

Größe der streuenden Bereiche

Auf SCHERRER geht eine einfache Beziehung zurück, die es erlaubt, aus der Verbreiterung von Debye-Ringen Rückschlüsse auf die Größe der streuenden Teilchen zu ziehen (1):

$$B = \frac{K \cdot \lambda}{L \cdot \cos \vartheta}$$

B charakterisiert die Halbwertbreite eines Debye-Rings, K ist eine empirische Konstante, λ die Wellenlänge der verwendeten Röntgenstrahlung, L ist die durchschnittliche Länge der Kristallite und ϑ ist der Beugungswinkel.

Die Anwendung dieser Beziehung zur Bestimmung der Größe der streuenden Bereiche eines Thylakoidstapels stößt auf die gleichen Schwierigkeiten, wie die exakte Bestimmung der Beugungsintensitäten. Voraussetzung wäre eine genaue Bestimmung der Halbwertbreite B; diese ist jedoch nicht durchführbar.

Ergebnisse der röntgenographischen Untersuchungen

Die aus den Beugungsdiagrammen ermittelten d-Werte, die ihnen zuzuordnenden Indizes (hkl) und die rückgerechneten d-Werte sind mit den geschätzten, relativen, integralen Intensitäten in Tabelle 2 zusammengefaßt. Die Abbildungen 13, 14 und 15 zeigen die Indizierung der d-Werte im reziproken Gitter. Die Beschriftung ist dem Gewicht der Index-Tripel angepaßt: Die große Schrift kennzeichnet Indizes, die allein

einem experimentell bestimmten d-Wert zugeordnet werden können. Die mittelgroße wurde für Indizes benutzt, von denen zwei zu einem Meßwert gehören. Die kleine Schrift bezeichnet Indizes, von denen drei einem ermittelten d-Wert zuzuordnen sind. Die Kreise symbolisieren Index-Tripel, von denen vier bis acht durch einen Meßwert repräsentiert werden. - Abbildung 12 gibt eine graphische Darstellung der experimentell gefundenen Reflexe.

Die röntgenographischen Untersuchungen zeigen, daß Stapelung und "Flächengitter" getrockneter Thylakoide von *Rhodospseudomonas viridis* voneinander nicht unabhängig sind: Indizes (h1l) und (h2l) dürften sonst nicht auftreten.

Es liegt ein dreidimensionales monoklines Gitter mit den Parametern

$$\begin{aligned} a_0 &= 117.5 \text{ \AA} \\ b_0 &= 92.8 \text{ \AA} \\ c_0 &= 120.9 \text{ \AA} \\ \beta &= 119^\circ \end{aligned}$$

und $a_0 : 1 : c_0 = 1.266 : 1 : 1.303$
als Achsenverhältnis vor.

Der räumliche Aufbau dieses monoklinen Thylakoidgitters ist in Abbildung 16 mittels der axonometrischen Parallelprojektion (17) dargestellt. Der Rotationswinkel beträgt 18.5° , der Inklinationswinkel 9.5° .

Die Richtung von b_0 ist mit der Stapelnormale B der Thylakoidstapel identisch. a_0 und c_0 stehen auf dieser Richtung senkrecht. Von ihnen wird der monokline Winkel β eingeschlossen.

In diesem Gitter müssen die Thylakoide in Form "hochkant stehender Scheiben" angeordnet sein. Sie sind schraffiert dargestellt. Obere Membran oM und untere Membran uM eines Thylakoids erscheinen spiegelsymme-

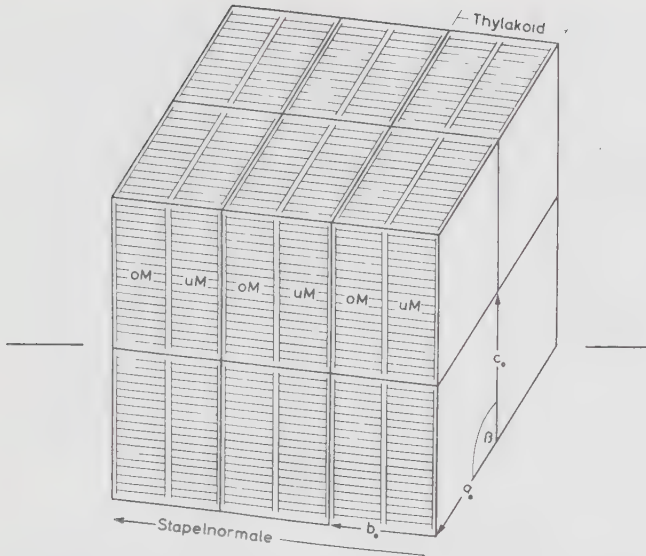


Abb. 16: Räumliche Darstellung des Kristallgitters getrockneter Thylakoidstapel. Obere Membran oM und untere Membran uM wechseln sich in Richtung der Stapelnormale ab.

trisch (vgl. Abb. 1, 2 und 24). Berücksichtigt man, das, so ist nur die hier wiedergegebene Anordnung der Thylakoide im Gitter denkbar.

Das elektronenmikroskopische "Flächengitter" gibt den Aufbau der Membranen in nicht genauer festzulegenden (h0l)-Ebenen des Thylakoidgitters wieder (Abb. 3, 4, 21, 22 und 25). Die Abbildungen zeigen, daß auf der Abbildungsebene eine zweizählige Symmetrieachse senkrecht steht. Unterstellt man, daß dies generell für den Membranaufbau gilt, so läge in Richtung der b-Achse eine zweizählige Drehungsachse vor und die Thylakoidstruktur wäre in die Kristallklasse $C_{2h}^{-2/m}$ einzuordnen.

Berücksichtigt man, daß die trockenen Thylakoidstapel durch Wasseraufnahme in den aktiven Zustand übergehen können, zwischen den Membranen bilden sich dann die "loculi" und "interdisk-spaces", so ist eine c-flächenzentrierte Elementarzelle unwahrscheinlich. Als Raumgruppen sind für die Struktur getrockneter Thylakoidstapel also $C_{2h}^1 - P 2/m$ oder $C_{2h}^2 - P 2_1/m$ denkbar (11).

C. DISKUSSION

Korrelation

Die Analyse der Thylakoidstapel von *Rhodospseudomonas viridis* ist mit Hilfe grundverschiedener Untersuchungstechniken an sehr unterschiedlich präpariertem Untersuchungsmaterial durchgeführt worden. Dünnschnittpräparate, negativkontrastierte und Pt/C-bedampfte Präparate sowie Gefrierätzungen wurden elektronenmikroskopisch untersucht. Die Analyse getrockneter Thylakoide erfolgte mit Hilfe der Röntgenbeugung. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

Tabelle 3: Gegenüberstellung der elektronenmikroskopischen und röntgenographischen Daten der Thylakoidstruktur.

Elektronenmikroskopie		Röntgenographische Analyse	
visuelle Auswertung	Laser-Auswertung	getrockneter Thylakoide	
B	186 Å	200 Å	
		b_0	92.8 Å
a	118 Å	103 Å	a_0 117.5 Å
c	121 Å	107 Å	c_0 120.9 Å
β	119 ⁰	119 ⁰	β 119 ⁰

B legt den Abstand von der Mitte eines Thylakoids zur Mitte des nächsten fest, a, c und β sind die elektronenmikroskopischen Parameter des sogenannten "Thylakoid-Flächengitters". a_0 , b_0 , c_0 und β sind die röntgenographisch ermittelten Konstanten des dreidimensionalen monoklinen Kristallgitters getrockneter Thylakoidstapel.

Die Richtungen, in denen B und b_0 gemessen werden, sind identisch. Dabei ist $2b_0 \approx B$. Die Ursache dafür

liegt wahrscheinlich in der radikalen Entwässerung der Röntgenpräparate.

Vergleicht man die elektronenmikroskopischen Werte a und c mit den röntgenographischen a_0 und c_0 , so fällt folgendes auf: Die aus Elektronenmikroskop-Aufnahmen visuell bestimmten a und c stimmen hervorragend mit a_0 und c_0 überein, die mit dem Laser-Diffraktometer bestimmten a und c jedoch nicht. Dieser Widerspruch klärt sich auf, wenn man die für die verschiedenen Präparationstechniken visuell ermittelten Werte in Tabelle 1 miteinander vergleicht: Die aus Gefrierätz-aufnahmen bestimmten Werte weichen weit nach oben ab und beeinflussen die Mittelwerte derart, daß sie rein zufällig die beste Übereinstimmung mit den röntgenographischen Daten aufweisen.

Die mit dem Laser-Diffraktometer für a und c erhaltenen Werte weichen um etwa 10% von den röntgenographischen Daten ab. Es läßt sich zeigen, daß ein größeres Maß an Übereinstimmung auch gar nicht erwartet werden kann.

Die untersuchten Thylakoidstapel zeichnen sich durch eine dreidimensionale Struktur aus. Elektronenoptisch wird diese Struktur jedoch zweidimensional abgebildet. Die Folge sind geometrische Verzerrungen, die sich ganz unterschiedlich auswirken.

Röntgenographische Untersuchungen werden von derartigen geometrischen Verzerrungen nicht beeinflusst. Die röntgenographischen Daten müssen deshalb zwangsläufig genauer sein, als die aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Erkauft wird diese Genauigkeit mit dem nahezu vollständigen Verlust der Anschaulichkeit. Werden wie hier beide Methoden konsequent eingesetzt, so kann die erwünschte Exaktheit erreicht werden, ohne daß die Anschaulichkeit verloren geht.

Die Auswertung der Röntgendiagramme hat gezeigt, daß erst zusätzliche Informationen den Nachweis eines dreidimensionalen Kristallgitters bei den getrockneten Thylakoiden von *Rhodospseudomonas viridis* ermöglichte. Diese Informationen waren mit Hilfe der Polarisationsmikroskopie erhalten worden. Der Grund für die Schwierigkeiten, die aufgetreten waren, ist in den beschriebenen Überlagerungseffekten und den sehr kleinen Teilchen zu sehen, aber auch im Thylakoidgitter selbst. Der monokline Winkel β weicht mit 119° nur sehr wenig von dem hexagonalen 120° -Winkel ab, a_0 und c_0 unterscheiden sich nur um $3.4 \text{ \AA}$.

Die Folge ist, daß vor allem höher indizierte Beugungsmaxima sehr dicht beieinander liegen. Die Verbreiterung dieser Maxima durch den Teilchengrößeneffekt führt dann bei einem so großen Gitter zwangsläufig dazu, daß Sammelmaxima gemessen werden. Zwei oder mehr Index-Tripel fallen dann auf einen Meßwert (vgl. Tabelle 2 und Abbildungen 13, 14 und 15).

Trotzdem gelingt es, die Debye-Ringe der Gitterebenen (100), (200), (001), (101), (203), (302), (010), (110), (210), (310), (011), (111), (013) und (030) einzeln nachzuweisen. Das sind 35% der zur Thylakoidstruktur gehörenden Beugungsmaxima.

Bei dreizehn gemessenen d-Werten gelang die Indizierung nicht: Diese Reflexe müssen zu Verunreinigungen gehören, die trotz der aufwendigen Reinigung des Untersuchungsmaterials nicht restlos zu eliminieren waren. Hier ist die röntgenographische Untersuchung der Elektronenmikroskopie unterlegen. Im elektronenmikroskopischen Bild sind Fremdpartikel zu erkennen und bleiben unbeachtet. Röntgenstrahlen hingegen werden an kristallinen Fremdstoffen genauso gebeugt, wie an der zu untersuchenden Struktur. - Diese nicht indizierten

Reflexe zeigen, daß in *Rhodopseudomonas viridis* neben den Thylakoiden andere kristalline Zellbestandteile vorliegen; wahrscheinlich sind es die Zellwand und die Cytoplasma-Membran dieser Bakterien.

Für die möglichen Gitterebenen (002), (004), (214), (314), (313), (413) und (412) konnten Debye-Ringe nicht nachgewiesen werden. Das deutet auf gesetzmäßige Auslöschungen hin. Diese "Lücken" würden zusätzliche Informationen über die Symmetrie des Thylakoidgitters geben. Die diskutierten Überlagerungseffekte lassen jedoch eine eindeutige Aussage nicht zu.

Schließlich stellt sich die Frage nach der Genauigkeit der röntgenographischen Daten. Die Schwierigkeiten bei der Auswertung sind schon erörtert worden. Grundlage der graphischen und rechnerischen Auswertung waren die sogenannten Gruppen-d-Werte. Nur so war es möglich, die Struktur zu klären: Ein solches quasi statistisches Verfahren zur Auswertung "verschmierter" Röntgendiagramme ist bisher nicht bekannt. - Die Genauigkeit läßt sich abschätzen, indem man bei den einzeln nachgewiesenen Reflexen gemessene und rückgerechnete d-Werte vergleicht. Bildet man die Differenz $d(\text{gemessen}) - d(\text{rückgerechnet})$, addiert die Beiträge auf und mittelt, so erhält man als Maß für die Genauigkeit eine mittlere Abweichung von $\pm 0.23 \text{ \AA}$. Dieser Wert liegt weit unterhalb der Auflösungsgrenze von Elektronenmikroskopen! Darin zeigt sich die Überlegenheit röntgenographischer Untersuchungen.

Das Gewicht der elektronenmikroskopischen Aussagen wird jedoch primär nicht von der Auflösungsgrenze der Geräte bestimmt, sondern von methodisch bedingten Schwierigkeiten. Das auffälligste Beispiel bietet die Bestimmung der Stapelparameter: Aufnahmen wurden von Dünnschnitt- und Gefrierätzpräparaten erhalten. Die Auswertung erfolgte visuell und mit dem Laser-Diffrak-

Tabelle 4:

Gegenüberstellung der größten und kleinsten Werte, die für die Identitätsperioden in der Richtung der Stapelnormalen und im "Flächengitter" der Thylakoide gefunden wurden. Der obere Teil der Tabelle enthält die visuell ermittelten, der untere Teil die mit Hilfe der Laser-Diffraktion bestimmten Daten. Anm - Angabe nicht möglich.

Präparationsmethode	Stapelung B	"Flächengitter" a		c
		Anm	Anm	
Dünnschnitttechnik	110 Å/183 Å			
Tropfpräparate				
Negativkontrastierung	Anm	89 Å/125 Å	92 Å/125 Å	
Pt/C - Bedampfung	Anm	97 Å/130 Å	100 Å/130 Å	
Gefrierätzung	190 Å/285 Å	113 Å/147 Å	115 Å/160 Å	
Dünnschnitttechnik	102 Å/160 Å			
Tropfpräparate				
Negativkontrastierung	Anm	86 Å/111 Å	92 Å/114 Å	
Pt/C - Bedampfung	Anm	90 Å/110 Å	92 Å/115 Å	
Gefrierätzung	190 Å/230 Å	105 Å/114 Å	106 Å/118 Å	

tometer. Tabelle 1 enthält die Ergebnisse und die Standardabweichungen. Rückschlüsse auf die methodisch bedingten Schwierigkeiten lassen die Standardabweichungen aber nicht zu. Diese sind eher möglich, wenn die kleinsten und größten gefundenen Werte einander gegenübergestellt werden. Das ist in Tabelle 4 geschehen.

Vergleicht man die Werte für die Stapelung, die aus Dünnschnittpräparaten ermittelt wurden, mit denen aus Gefrierätzpräparaten, so wird deutlich, daß beide Wertgruppen ganz verschieden beurteilt werden müssen: Bei der Dünnschnitttechnik wirken sich Schrumpfungerscheinungen aus, bei der Gefrierätzung nicht. Darauf hat schon GIESBRECHT (5) hingewiesen. Der Abstand von Thylakoid zu Thylakoid betrug $B \approx 2b_0 \approx 190 \text{ \AA}$. Die Werte aus Dünnschnitten liegen darunter, die aus Gefrierätzungen darüber: Aus diesen Abweichungen lassen sich quantitative Aussagen über den Einfluß dieser Präparationstechniken auf die Ergebnisse ableiten.

Bei beiden Methoden ist die Schnitt- bzw. Bruchrichtung ausschließlich vom Zufall abhängig. Die richtige Aussage wird aber nur dann erhalten, wenn die Thylakoidstapel exakt in Richtung der Stapelnormalen (b-Achse) angeschnitten oder angebrochen werden. Schliessen Stapelnormale und Schnittrichtung den Winkel γ ein, so wird der Abstand B von Thylakoid zu Thylakoid umso größer gemessen, je größer dieser Winkel ist.

$$B = \frac{190}{\cos \gamma} [\text{\AA}]$$

gibt den Zusammenhang quantitativ wieder. Beträgt z.B. $\gamma = 30^\circ$, so ist $\cos \gamma = 0.866$, für B erhält man dann $215 \text{ \AA}$. Dieser Wert wäre um 16% zu groß.

Wird eine statistisch auswertbare Anzahl von Gefrierätzpräparaten ausgewertet, so ist also nicht der Mittelwert sondern der kleinste überhaupt auftretende Wert der Richtige. Das ist auch der Fall: 190 Å wurden bei Gefrierätzpräparaten als kleinstes B gefunden.

Die größten gemessenen Werte sind fast noch interessanter: Bei der visuellen Auswertung wurden 285 Å, bei der Diffraktometer-Auswertung 230 Å als größte Werte für B registriert. Das bedeutet, daß Schrägbrüche von 50° visuell nicht als solche erkannt und in die Auswertung einbezogen werden. Dagegen erhält man bei Schrägbrüchen über 35° mit dem Diffraktometer keine auswertbaren Diffraktogramme. Hier werden Schrägbrüche schon bei kleinerem γ eliminiert.

Analoge Überlegungen sind auch bei der Dünnschnitttechnik gültig. Jedoch zeigt Tabelle 4, daß hier die kleinsten Werte mit 110 Å und 102 Å um 45% unter dem Bezugswert liegen. Das ist in der Präparation begründet: Die Bakterien werden fixiert, kontrastiert, mit Alkohol und Aceton entwässert. Die in der Struktur eingebauten Lipide werden dabei teilweise extrahiert. Beim Einbetten in Kunststoff sind die Thylakoidstapel weiteren Schrumpfungsvorgängen ausgesetzt. Dadurch wird in Richtung der Stapelnormalen eine Verkleinerung der Stapelausdehnung um 45% bewirkt. GIESBRECHT hatte diesen Schwund auf 40% geschätzt.

Die elektronenmikroskopisch sichtbaren "Flächengitter" sind (h0l)-Ebenen der Thylakoidstruktur. Wenn solche Schichten elektronenmikroskopisch untersucht werden, so liegen sie selten völlig parallel zur Abbildungsebene. Die Projektion eines Gitters aber, das gegen eine Ebene verkippt ist und in diese Ebene projiziert wird, kann nie größere Parameter aufweisen als das

Gitter selbst. Das heißt, daß bei den elektronenmikroskopisch bestimmten Daten des "Flächengitters" die größten gefundenen Werte die "richtigsten" sein müssen.

Vergleicht man in Tabelle 4 die mit dem Diffraktometer bestimmten a und c mit den röntgenographischen a_0 und c_0 , so trifft das zu. Bei den visuell erarbeiteten Daten liegen a und c über den röntgenographischen Gitterkonstanten: Hier dominieren kleine Meßfehler, vor allem aber systematische Fehler bei der photographischen Nachvergrößerung der Originalaufnahmen (vgl. Anhang). - Hier zeigt sich wiederum der Nutzen einer Auswertung elektronenmikroskopischer Aufnahmen mit dem Laser-Diffraktometer.

Weder die Standardabweichungen noch ein Vergleich der kleinsten und größten Werte geben einen eindeutigen Hinweis auf eine mögliche Verfälschung des "Flächengitters" durch präparative Maßnahmen. Erst ein Vergleich der Abbildungen 19 und 21 (Negativkontrastierungen) mit den Abbildungen 21 und 22 zeigt, daß die Platin/Kohlenstoff-Bedampfung zur Darstellung des "Flächengitters" nicht die beste Methode ist. Einzelheiten und die Gitterrichtungen sind auf den Abbildungen 21 und 22 wesentlich schlechter zu erkennen. Die Ursache liegt vermutlich darin, daß die Struktur von den auftreffenden heißen Platin- und Kohlenstoffpartikeln angeschmolzen wird und sich beim Erstarren Gitterbaufehler einstellen; das "Flächengitter" erscheint verwackelt.

Biologisches Modell

Die Ausdehnung der Thylakoidstapel in den Bakterien von *Rhodospseudomonas viridis* wird von den Abbildungen 5 und 6 nahezu ideal wiedergegeben. Das längs-

gebrochene Bakterium (Abb. 5) erstreckt sich über $15 \times 10^3 \text{ \AA}$, der Thylakoidstapel in ihm ist $9.5 \times 10^3 \text{ \AA}$ lang. Dem Querbruch (Abb. 6) ist zu entnehmen, daß der Durchmesser von *Rhodopseudomonas viridis* bis zu $7 \times 10^3 \text{ \AA}$ betragen kann. In diesem Querbruch nimmt der Thylakoidstapel eine Fläche von $2 \times 10^7 \text{ \AA}^2$ ein. Betrachtet man die Bakterien in grober Annäherung als kleine Zylinder, so haben sie ein Zellvolumen von etwa $4 \times 10^{11} \text{ \AA}^3$. Das Volumen der gleichfalls zylindrischen Thylakoidstapel beansprucht davon $1.9 \times 10^{11} \text{ \AA}^3$. Das sind nahezu 50% des Zellvolumens! Hier zeigt sich die Bedeutung der Thylakoidstapel für die Bakterien.

Vergleichbare Membranen setzen sich aus 35% Lipiden, 45% Proteinen sowie verschiedenen Chlorophyllen zusammen (9, 14, 20). Exakte Angaben über den Chemismus der Thylakoide von *Rhodopseudomonas viridis* liegen jedoch nicht vor. Bei dem Versuch ein biologisches Modell abzuleiten, sind daher Diskussionsmöglichkeiten nicht möglich.

Ausgangspunkt der Untersuchungen waren die Aussagen von GIESBRECHT und DREWS (5). Sie werden durch die beschriebenen und diskutierten Serienauswertungen elektronenmikroskopischer Aufnahmen präzisiert. Die genauesten Daten über den Aufbau der Thylakoidstapel in lebenden *Rhodopseudomonas viridis* vermitteln dabei die mit dem Laser-Diffraktometer aus Gefrierätztaufnahmen erhaltenen Befunde.

Der Abstand der Thylakoide voneinander beträgt danach $B = 190 \text{ \AA}$. Als Parameter des sogenannten "Flächengitters" waren $a = 114 \text{ \AA}$ und $c = 118 \text{ \AA}$ sowie $\beta = 119^\circ$ gefunden worden. Die Differenzen zu den röntgenographischen $a_0 = 117.5$ und $c_0 = 120.9 \text{ \AA}$ betragen 3.5 und $2.9 \text{ \AA}$. Das zeigt, daß auch die "richtigsten" elektronenmikroskopischen Konstanten a und c aus einem gegen die Ab-

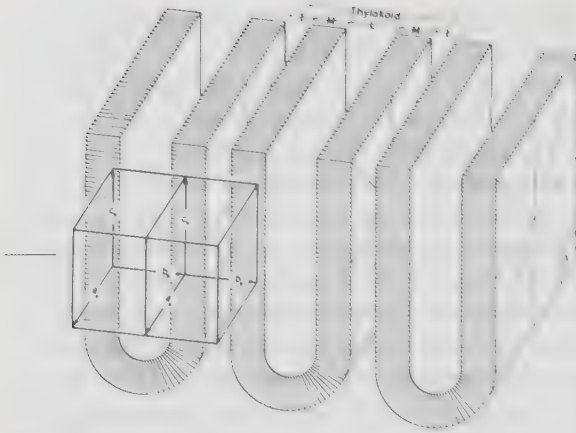


Abb. 17: Aufbau des aktiven Thylakoidstapels; M-Thylakoidmembran, maximal 46.4 Å dick, I-"interdisk-space", 50 Å, L-"loculus", 60 Å. Eine Elementarzelle besteht aus zwei Elementarzellen der Trockenstruktur (Abb. 18). Es ist $a_0 = 117.5$ Å, $c_0 = 120.9$ Å, $b = 119$ und $B = 2b_0 = 190$ Å.

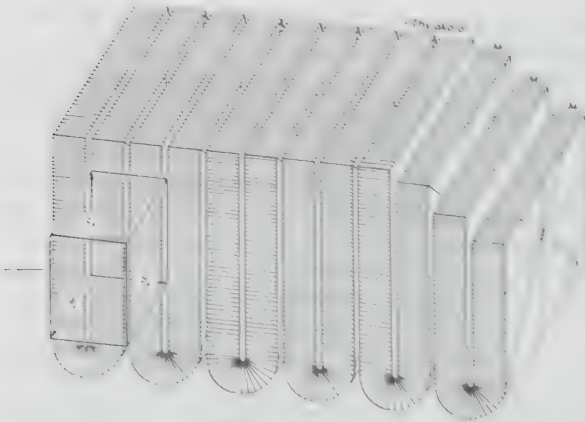


Abb. 18: Trockenstruktur eines Thylakoidstapels; $a_0 = 117.5$ Å, $c_0 = 120.9$ Å, $b = 119$ und $b_0 = 92.8$ Å. Die Dicke der Membranen beträgt maximal $b_0/2 = 46.4$ Å (vgl. Abb. 20).

bildungsebene verkippten "Flächengitter" erhalten wurden. Der Schluß ist naheliegend, daß die röntgenographischen Daten den Flächenaufbau der Thylakoide exakter beschreiben, als die elektronenmikroskopischen Werte.

Für die dritte Richtung des Thylakoidgitters trifft dies nicht zu. In Richtung der Stapelnormalen muß sehr wohl zwischen elektronenmikroskopischen und röntgenographischen Aussagen unterschieden werden. Es wurden $B = 190 \text{ \AA}$ und $b_0 = 92.8 \text{ \AA}$ gefunden: Aus den vorliegenden Untersuchungen resultieren also zwangsläufig zwei Modelle der Thylakoidstruktur. Ein Modell der Thylakoidstapel in vivo und ein Modell der Trockenstruktur der Thylakoidstapel.

Abbildung 24 zeigt den Aufbau eines Thylakoidstapels in einer latent lebenden Zelle, so wie er sich in der Gefrierätzung darstellt. Abbildung 17 gibt den Aufbau schematisiert wieder. Obere und untere Membranen M eines Thylakoids im Stapel sind spiegelsymmetrisch zueinander angeordnet. Sie schließen den "loculus" L ein, dessen Dicke recht genau $60 \text{ \AA}$ beträgt. Die Schicht zwischen den Thylakoiden, der "interdisk-space" I, ist nur halb so dick, nämlich $30 \text{ \AA}$.

Legt man die Identitätsperiode B in Richtung der Stapelnormalen von der Mitte eines "interdisk-space" zur Mitte des nächsten, so wird eine Elementarzelle des aktiven Thylakoidstapels von zwei Elementarzellen des getrockneten Stapels (Abb. 18) gebildet. Im aktiven Thylakoidstapel ist dann $a_0 = 117.5 \text{ \AA}$, $c_0 = 120.9 \text{ \AA}$, $B = 119^\circ$ und $B \approx 2b_0 \approx 190 \text{ \AA}$.

Der Feinbau der Membranflächen ist in den Abbildungen 17 und 18 stilisiert dargestellt; auf den sichtbaren Membranaußenflächen sind die Richtungen des "Flächengitters" und der monokline Winkel β wiedergegeben.

Die Abbildungen 19, 21, 22, 23 und 25 zeigen den Aufbau der Membranflächen, wie er sich im elektronenmikroskopischen Bild darstellt. Bemerkenswert ist der dreischichtige Aufbau der Thylakoidmembran, der sich in der Gefrierätzung (Abb. 25) andeutet. Oberhalb und unterhalb einer dünnen Zwischenschicht Z sind Partikel angeordnet. Auf diesen Membranschichten steht offensichtlich eine zweizählige Symmetrieachse senkrecht. Diese Beobachtung war schon zur Festlegung der Kristallklasse dienlich.

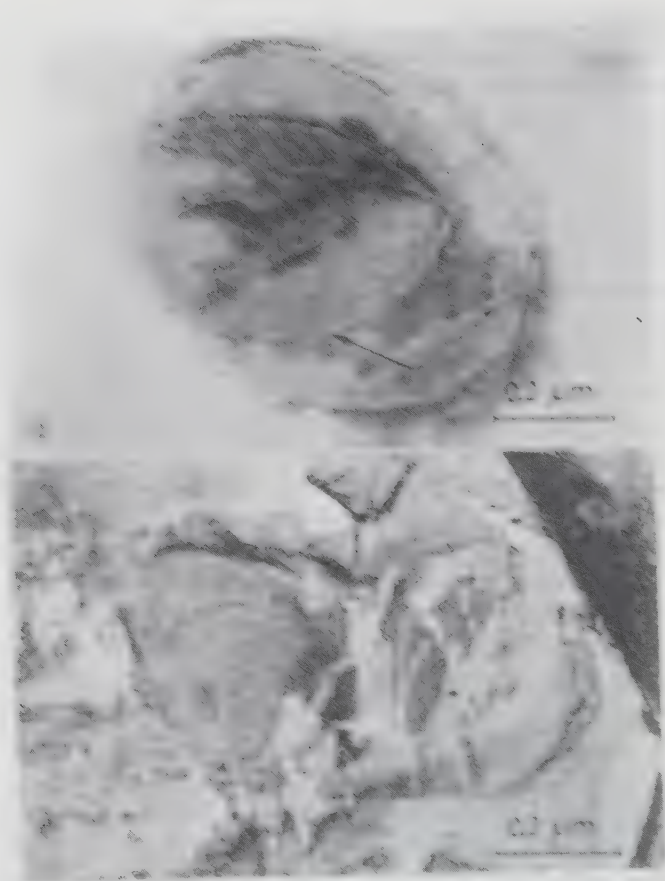
Die in Abbildung 18 dargestellte Trockenstruktur der Thylakoidstapel würde entstehen, wenn man den aktiven Stapeln das Wasser entzieht. Die "interdisk-spaces" und "loculi" sind dann ausgetrocknet und nicht mehr zu unterscheiden. Die Membranen bleiben unverändert. In Richtung der Stapelnormalen wird dann als Identitätsperiode $b_0 = 92.8 \text{ \AA}$ gefunden: Die aktiven Thylakoidstapel müssen also zu 50% aus Wasser bestehen, das sich im Verhältnis 1:2 auf die "interdisk-spaces" und die "loculi" verteilt. An der Trockenstruktur wird sichtbar, daß die Membrandicke maximal $b_0/2 = 46.4 \text{ \AA}$ betragen kann.

Abbildung 20 zeigt die Gefrierätzungsaufnahme einer treppenartig ausgebrochenen Trockenstruktur. Sie zeigt deutlich, daß der zylindrische Habitus der Thylakoidstapel trotz Isolierung und Trocknung erhalten geblieben ist. Damit wird sichtbar, warum Textureffekte auf den Röntgendiagrammen nicht beobachtet werden konnten. Dieses Gefrierätzpräparat wurde von einem Röntgenpräparat erhalten, das 430 Stunden bestrahlt worden war: Diese Bestrahlung hat die Struktur offenbar nicht erkennbar verändert.

Die Bakterien, deren Thylakoidsystem hier untersucht wurde, lassen sich durch Gefriertrocknung konservieren. Durch Wasseraufnahme werden sie wieder lebensfähig. Die Umwandlung des aktiven Thylakoidstapels

in die Trockenstruktur muß reversibel sein. Diese hochgeordnete Trockenstruktur bildet also als energetisch günstigste Form der Thylakoidstapel deren Überlebensstruktur.

Vergleichbare Variationen im Stapelparameter sind übrigens sogar unter physiologischen Bedingungen beschrieben worden (3): Beim Wechsel zwischen Beleuchtung und Abdunklung ließen sich deutlich erkennbare Veränderungen in der Dichte der Einzelthylakoide nachweisen, die hauptsächlich den "loculus" betrafen.



11. *Mediospindomonas viridis*; Negativkontrast, isolierten Phylakondstapels, EM 120 000 : 1. Die miteinander liegende (Okk)-Flächen der Stapes sind sichtbar.

12. *Mediospindomonas viridis*; EM 120 000 : 1. Die Abbildung eines isolierten und getrockneten Stapes nach der röntgenographischen Untersuchung. Der geschlossene Stapes ist leicht wellig gebogen.

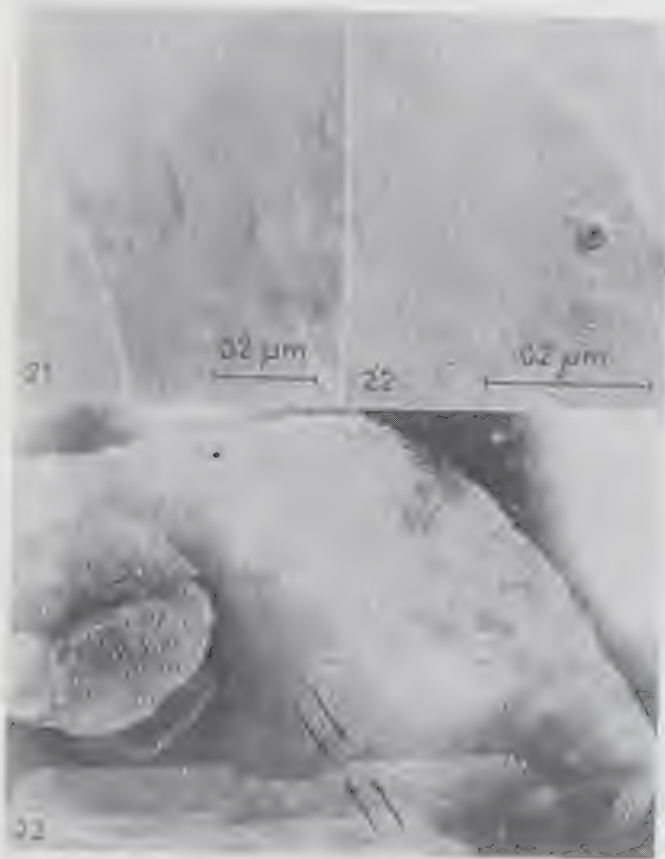


Abb. 21 und 22: *Rhodospirillum rubrum*; isolierte Thylakoide, Pt/C-Bedampfung, EM 100 000 : 1 und 160 000 : 1. Die Gitter in den (0k0)-Ebenen sind nur in kleinen Bereichen unversehrt erhalten, sie erscheinen "verwackelt" (GIESBRECHT, 6).

Abb. 23: *Rhodospirillum rubrum*; isolierte Thylakoide, Negativkontrastierung, EM 150 000 : 1. Das "Flächengitter" ist tadellos erhalten, die Achsenrichtungen übereinanderliegender Thylakoide stimmen überein (Pfeile).



Abb. 24: *Rhodospseudomonas viridis*; Thylakoidstapel durch Gefrierätzung dargestellt, EM 100 000 : 1. "Loculus" und "interdisk-space" (Pfeile) sind gut zu unterscheiden (GIESBRECHT, 6)

Abb. 25: *Rhodospseudomonas viridis*; Gefrierätzung, Schrägbruch durch einen Thylakoidstapel, EM 100 000 : 1. Die Thylakoidmembranen sind dreischichtig aufgebaut. Zwischen einer oberen Partikelschicht αP , die zum größten Teil abgelöst ist, und einer unteren Partikelschicht αP liegt eine dünne Zwischenschicht Z (GIESBRECHT, 6).

Die röntgenographischen Untersuchungen wurden an getrockneten Thylakoidstapeln von *Rhodospseudomonas viridis* durchgeführt. Sie wurden durch ein neuartiges Präparationsverfahren wesentlich erleichtert, das die Herstellung trägerfreier Röntgenpräparate gestattet.

Im getrockneten Zustand bilden die Thylakoide ein dreidimensionales monoklines Kristallgitter mit den Gitterkonstanten $a_0 = 117.5 \text{ \AA}$, $b_0 = 92.8 \text{ \AA}$, $c_0 = 120.9 \text{ \AA}$ und $\beta = 119^\circ$. Dieses Kristallgitter bildet als energetisch günstigste Form offenbar die "Überlebensstruktur" der Thylakoidstapel. Der sonst deutlich sichtbare Unterschied zwischen "loculus" und "interdisk-space" ist hier verschwunden. Die Dicke von oberer und unterer Membran eines Thylakoids in dem getrockneten Stapel muß dabei etwa $b_0/2$, also $40 \text{ \AA}$ bis $46.4 \text{ \AA}$ betragen.

Der Vergleich der röntgenographischen Werte mit den aus Gefrierätz-Aufnahmen erhaltenen Daten zeigt, daß zwischen der "Überlebensstruktur" und dem photochemisch aktiven Thylakoidstapel kein grundsätzlicher Unterschied besteht. Bei der "Aktivierung" eines trockenen Thylakoidstapels durch Aufnahme von Wasser lokalisieren sich offenbar die Bindungskräfte der dreidimensionalen "Überlebensstruktur" in Richtung der b -Achse, sodaß "loculi" und "interdisk-spaces" aufquellen und ihre charakteristischen Dicken von $50 \text{ \AA}$ und $60 \text{ \AA}$ einnehmen. Der Abstand von Thylakoid zu Thylakoid wächst dabei auf $2b_0 \approx 190 \text{ \AA}$ an. Dagegen sind Dicke und Aufbau der Thylakoidmembran in der "Überlebensstruktur" und im aktiven Thylakoidstapel mit großer Wahrscheinlichkeit identisch. - Die geringen Abweichungen, $117.5 \text{ \AA}/114 \text{ \AA}$ und $120.9 \text{ \AA}/118 \text{ \AA}$, haben ihre Ursachen offenbar in Verzerrungen der Struktur bei der elektro-nenoptischen Abbildung.

Abschließend sei erwähnt, daß die Gegenüberstellung der auf unterschiedliche Weise erhaltenen Daten auch quantitative Aussagen über den Einfluß der verschiedenen elektronenmikroskopischen Präparationstechniken auf die untersuchten Membranstrukturen erlaubt.

Bezeichnet man die Winkel im reziproken Gitter mit α^+ , β^+ und γ^+ , so gilt zwischen reziproken und reel-
len Gittern generell folgende Winkelbeziehung:

$$\cos \beta^+ = \frac{\cos \alpha \cdot \cos \gamma - \cos \beta}{\sin \alpha \cdot \sin \gamma}$$

Bei einem monoklinen Gitter, wie es bei den Thyla-
koiden vorliegt, ist $\alpha = \gamma = 90^\circ$, also $\cos \alpha = \cos \gamma = 0$
und $\sin \alpha = \sin \gamma = 1$, als Winkelbeziehung resultiert
dann:

$$\begin{aligned} \cos \beta^+ &= -\cos \beta \\ \text{d.h. } \cos \beta^+ &= \cos (180 - \beta) \end{aligned}$$

Im Thylakoidgitter beträgt $\beta = 119^\circ$, der reziproke Win-
kel ist also $\beta^+ = 61^\circ$.

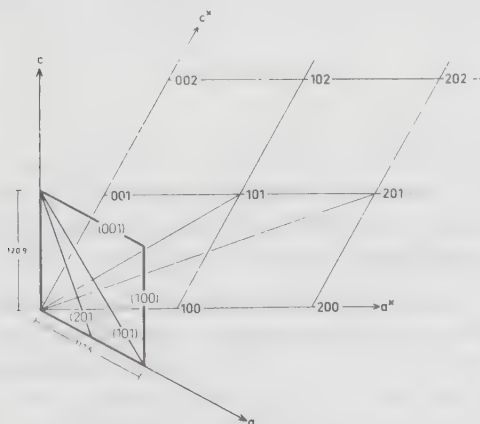


Abb. 26: Darstellung der Beziehungen zwischen reel-
lem und reziprokem Thylakoidgitter.

Abbildung 26 verdeutlicht das Verhältnis zwischen reellem und reziprokem Gitter. Beide Gitter haben, wie gefordert, den gleichen Ursprungspunkt. Das reelle Gitter ist durch stärkere Linien hervorgehoben. Die reellen Gitterachsen a und c schließen den monoklinen Winkel β ein. Die reelle b -Achse muß als im gemeinsamen Ursprungspunkt senkrecht auf der Zeichenebene stehend gedacht werden. Die Richtungen der reziproken Achsen a^+ und c^+ entsprechen der gegebenen Definition, sie schließen den reziproken Winkel β^+ ein. Die Richtung von b^+ ist identisch mit der Richtung der reellen b -Achse.

Die Normalen vom Gitterursprung auf die reellen Netzebenen (100), (001), (101) und (201) repräsentieren die d -Werte dieser Netzebenen. Die Verlängerung dieser Normalen führt zu den entsprechenden Gitterpunkten des reziproken Gitters. Die Länge dieser Verbindungslinien (Fahrstrahlen) beträgt $1/d_{(100)}$, $1/d_{(001)}$, $1/d_{(101)}$ und $1/d_{(201)}$.

Fehlerbetrachtung

Die Vergrößerungsangabe bei sämtlichen Elektronenmikroskopen ist mit einem Gerätefehler behaftet. Er ist von der jeweils gewählten Primärvergrößerung abhängig und beträgt etwa $\pm 3\%$ bis $\pm 5\%$.

Eine direkte visuelle Auswertung elektronenmikroskopischer Originalaufnahmen hätte, z.B. bei einer Primärvergrößerung von 20 000 : 1 und einem individuellen Meßfehler von nur 0,3 mm, eine Abweichung von 15 Å zur Folge. Die quantitative Auswertung erfolgt daher anhand von Vergrößerungen.

Durch Einstellfehler beim Vergrößern und durch die Veränderung des Photopapiers beim Entwickeln, Fixie-

ren, Wässern und Trocknen werden wiederum kaum abschätzbare systematische Fehler in das Auswerteverfahren gebracht. Die Summe dieser Fehler ist jedoch kleiner, sodaß die Auswirkungen individueller Meßfehler um etwa 30% reduziert werden (vgl. Tabelle 1).

Bei der Auswertung der Originalaufnahmen mit dem Laser-Diffraktometer sind, vom Fehler bei der Primärvergrößerung abgesehen, bis zur Registrierung des Beugungsbildes hin, systematische Abweichungen weitgehend eliminiert. Bedingt durch die photographische Behandlung der Diffraktogramme ergeben sich auch hier systematische Fehler. Diese sind jedoch kleiner, als bei der Verarbeitung von Photopapier. Beträgt die Primärvergrößerung wieder 20 000 : 1 und der individuelle Meßfehler 0.3 mm, so beträgt die Abweichung vom wahren Wert nur noch etwa 3.5 Å.

In Tabelle 1 ist als Ergebnis der visuellen Auswertung von Vergrößerungen und der Auswertung mittels Laser-Diffraktometer für eine Gruppe (Präparations-typ) das arithmetische Mittel

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad i = 1, 2, 3, \dots, 50$$

angegeben. Dabei ist $\bar{x}$ das arithmetische Mittel, x_i ein Einzelwert und n die Anzahl der Einzelmessungen.

Als Maß für die Genauigkeit der Mittelwerte ist die Standardabweichung (Streuung, mittlere quadratische Abweichung)

$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum x^2}{n-1}}$$

angegeben. Dabei ist x^2 mit $x = x_i - \bar{x}$ die algebraische Summe der Quadrate der Abweichungen der Einzel-

werte x_i vom Mittelwert $\bar{x}$.

Würden die Einzelwerte in einer einwandfreien Normalverteilung vorliegen, so müßten 68,3% von ihnen innerhalb einer von der Abszisse und der Glockenkurve umschriebenen Fläche mit den Grenzen $\bar{x} \pm s$ liegen, 95% in einer Fläche mit den Grenzen $\bar{x} \pm 2s$ und 99,7% in einer Fläche mit den Grenzen $\bar{x} \pm 3s$. Dies kann jedoch weder für die visuell ermittelten noch für die mit dem Laser-Diffraktometer bestimmten Werte zutreffen. Die Ursache dafür sind die diskutierten systematischen Fehler und die durch die elektronenmikroskopische Abbildungstechnik bedingten geometrischen Verzerrungen. Die Standardabweichung ist also nur im Rahmen der angegebenen Einschränkungen als Maß für die Genauigkeit der Mittelwerte anzusehen.

F. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 L.V.AZAROFF, M.J.BUERGER
The powder method
McGraw-Hill Book Company, New York - Toronto -
London (1958)
- 2 S.BOSECK, R.LANGE
Z. wiss. Mikrosk. 70, 65 - 79 (1970)
- 3 R.A.DILLEY
Progress in Photosynthesis Research, Vol.I
197 - 203 (1969)
- 4 G.DREWS, P.GIESBRECHT
Arch. Mikrobiol. 52, 242 - 250 (1965)
- 5 P.GIESBRECHT, G.DREWS
Arch. Mikrobiol. 54, 297 - 330 (1966)
- 6 P.GIESBRECHT
unveröffentlichte Elektronenmikroskop-Aufnahmen
- 7 P.GIESBRECHT in G.HENNEBERG ed.
Bildatlas pathogener Mikroorganismen, Vo. III,
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1969)
- 8 J.T.FINCH, A.KLUG, M.NERMUT
J.Cell.Sci. 2, 587 - 590 (1967)
- 9 T.W.GOODWIN ed.
Biochemistry of Chloroplasts
Academic Press, London and New York (1966)
- 10 R.HOSEMANN, S.N.BAGCHI
Direct Analysis of Diffraction by Matter
North-Holland Publishing Company, Amsterdam (1962)
- 11 INTERNATIONAL UNION OF CRYSTALLOGRAPHY
International Tables for Crystallography
Kynoch Press, Birmingham (1965)

- 12 W.KREUTZ
Advances in Botanical Research, Vol. III,
Academic Press, London and New York (1970)
- 13 W.MENKE
Ann. Rev. Plant. Physiol. 13, 27 -44 (1962)
- 14 H.METZNER ed.
Progress in Photosynthesis Research
- 15 H.MOOR
J. Ultrastruct. Res. 2 393 - 422 (1959)
Z. Zellforsch. 62, 546 - 580 (1964)
- 16 H.PAPE
Inaugural Dissertation
Freie Universität Berlin (1971)
- 17 P.RAMDOHR, H.STRUNZ
Klockmann's Lehrbuch der Mineralogie
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart (1967)
- 18 L.REIMER
Elektronenmikroskopische Untersuchungs-
und Präparationsmethoden
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1967)
- 19 F.THON, B.M.SIEGEL
Ber. d. Bunsen-Ges. 74, 1116 - 1120 (1970)
- 20 L.P.VERNON, G.R.SEELY ed.
The Chlorophylls
Academic Press, New York and London (1966)

G. LEBENSLAUF

29. 10. 1933	in Bautzen/Sachsen geboren.
1940 - 1953	Schulbesuch, Abschluß Abitur.
1954 - 1955	Vorsemester an der Technischen Universität Berlin.
1955 - 1957	Industriepraktika, Studienreisen.
1961	Vordiplom an der Technischen Universität Berlin.
1964	Humanistische Prüfungen an der Technischen Universität Berlin.
1957 - 1965	studentische Hilfskraft und Hilfsassistent am Institut für Mineralogie und Kristallographie der Technischen Universität Berlin.
1965 - 1966	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Kariesforschung e.V.
1966	Diplom-Hauptprüfung an der Technischen Universität Berlin.
	Prüfungsfächer: Anorganische, organische und physikalische Chemie, Verfahrenstechnik und technische Chemie.
	Diplom-Arbeit: Kristallchemie und Kristallmorphologie von Apatit.
	Abschluß: Diplom-Ingenieur der allgemeinen Ingenieurwissenschaften.
Seit 1967	wissenschaftlicher Angestellter im Robert Koch-Institut des Bundesgesundheitsamtes.

Diese Arbeit wurde im Robert Koch-Institut des Bundesgesundheitsamtes in Berlin angefertigt. Betreut wurde die Arbeit von Herrn Professor Dr. H. BRADACZEK und Herrn Professor Dr. P. GIESBRECHT. Beiden Herren danke ich für anregende Diskussionen und hilfreiche Kritik.

Der größte Teil der Elektronenmikroskop-Aufnahmen wurde mir von Herrn Professor Dr. P. GIESBRECHT zur quantitativen Auswertung überlassen. Auch dafür habe ich zu danken.

Frau Maultzsch, Firma Siemens, hat mir mit wertvollen Ratschlägen beim Bau des Laser-Diffraktometers geholfen, Frau Köhler führte die photographischen Arbeiten aus, Herr Rochow half bei der Verwirklichung technischer Arbeiten. In der letzten Phase der Arbeit war mir Frau Heideklang eine wertvolle Mitarbeiterin: Ihnen allen danke ich herzlich.

